

**GbsR:**  
**Ein neuer transkriptioneller Repressor**  
**in *Bacillus subtilis* zur Regulation des**  
**Cholin zu Glycin Betain Biosynthesewegs**

**Dissertation**  
**zur**  
**Erlangung des Doktorgrades**  
**der Naturwissenschaften**  
**(Dr. rer. nat.)**

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Daniela Opper**  
aus Alzey

Marburg/Lahn, 2009

Die experimentellen Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden im Zeitraum von Februar 2006 bis Oktober 2008 im Laboratorium für Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Erhard Bremer durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen  
am:

Erster Gutachter: Prof. Dr. Erhard Bremer

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch

Tag der mündlichen Prüfung:

## Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung .....	1
II. Einleitung .....	2
1. Die Auswirkung der Osmolarität auf die Bakterienzelle .....	2
2. Adaptation von Mikroorganismen an hochosmolare Bedingungen .....	4
2.1 „salt-in“-Strategie .....	4
2.2 „salt-out“-Strategie .....	5
3. Osmoregulation in halotoleranten Bakterien am Beispiel von <i>B. subtilis</i> .....	5
3.1 Erste Phase: Akkumulation von K <sup>+</sup> Ionen.....	7
3.2 Zweite Phase: Akkumulation von kompatiblen Soluten .....	8
4. Kompatible Solute.....	9
4.1 Wirkungsweise von kompatiblen Soluten .....	13
5. Aufnahme von kompatiblen Soluten in <i>B. subtilis</i> .....	14
6. Die Synthese von kompatiblen Soluten in <i>B. subtilis</i> .....	16
6.1 Die Rolle von Glutamat als Osmoprotektivum und die Akkumulation von Prolin durch <i>de novo</i> Synthese .....	16
6.2 Die Synthese von Glycin Betain .....	18
7. Zielsetzung der Arbeit .....	24
III. Material und Methoden .....	25
1. Chemikalien und Reagenzien.....	25
1.1 Verwendetet kompatible Solute und Aminosäuren.....	25
2. Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide .....	25
2.1 Bakterienstämme .....	25
2.1.1 <i>Escherichia coli</i> -Stämme .....	25
2.1.2 <i>Bacillus subtilis</i> -Stämme.....	26
2.2 Plasmide .....	27
2.3 Oligonukleotide.....	28
3. Medien und Zusätze .....	31
3.1 Medien.....	31
3.2 Medienzusätze und Antibiotika.....	33
4. Mikrobiologische Methoden .....	34
4.1 Sterilisation.....	34
4.2 Wachstumsbedingungen und Vermehrung von Bakterien.....	34
4.3 Ermittlung der Zelldichte .....	35

5. Molekularbiologische und genetische Methoden.....	35
5.1 Präparation von DNA.....	35
5.1.1 Präparation von Plasmid DNA.....	35
5.1.2 Präparation chromosomaler DNA aus <i>B. subtilis</i> .....	35
5.1.3 Präparation von Gesamt-RNA aus <i>B. subtilis</i> .....	36
5.2 Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	37
5.2.1 Aufreinigung von DNA.....	37
5.2.2 Aufreinigung von RNA.....	37
5.3 Bestimmung der Konzentrationen von Nukleinsäuren.....	38
5.4 DNaseI-Behandlung von RNA Proben.....	38
5.5 cDNA Synthese.....	38
5.6 Klonierungstechniken.....	38
5.6.1 Restriktion von DNA.....	38
5.6.2 Ligation von DNA-Fragmenten.....	38
5.6.3 Agarosegelelektrophorese.....	39
5.6.4 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR.....	39
5.7 Transformation von Bakterien.....	39
5.7.1 Transformation von <i>E. coli</i> .....	39
5.7.2 Transformation von <i>B. subtilis</i> .....	39
5.8 DNA-Sequenzierung.....	40
5.9 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA).....	40
5.10 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion.....	41
5.11 Analyse von mRNA-Startpunkten durch Primer Extension.....	42
5.12 Computeranalysen.....	42
6. Konstruktion von Plasmiden und Stämmen.....	43
6.1 Plasmidkonstruktionen.....	43
6.2 Stammkonstruktionen.....	46
6.2.1 Konstruktion von <i>treA</i> - Fusionsstämmen.....	46
7. Biochemische Methoden.....	48
7.1 Quantifizierung der Phosphoglucosidase (TreA)-Aktivität.....	48
7.2 Amylase-Test.....	49
7.3 Protein-Gelelektrophoresen unter denaturierenden Bedingungen.....	49
7.4 Protein-Gelelektrophoresen unter nativen Bedingungen.....	50
7.5 Proteinbestimmung mittels Absorptionsmessung.....	51
7.6 Überexpression und Reinigung von GbsR aus <i>B. subtilis</i> .....	51
7.6.1 Überexpression von GbsR aus <i>B. subtilis</i> .....	51
7.6.2 Zellaufschluss mittels „French Press“.....	52
7.6.3 Reinigung von GbsR über FPLC-Chromatographie.....	52
7.6.4 Dialyse des gereinigten GbsR-Proteins.....	53
7.7 Größenbestimmung des GbsR-Proteins.....	53
7.7.1 Gelfiltration.....	53
7.8 Fluoreszenzspektroskopische Bestimmung der Bindungsaffinität ( $K_D$ ) des GbsR-Proteins für die Substanzen Glycinbetain und Cholin.....	53
IV. Ergebnisse.....	55
1. Regulation der Glycin Betain Synthese.....	55
1.1 Regulation des <i>gbsAB</i> -Operons.....	55

1.1.1	Bestimmung der mRNA-Startpunkte der <i>gbsR</i> - und <i>gbsAB</i> - Transkripte .....	55
1.1.2	Regulation der Expression des <i>gbsAB</i> -Operons .....	57
1.1.2.1	Einfluss von Cholin und hoher Osmolarität auf die <i>gbsAB</i> -Expression .....	57
1.1.2.2	Bestimmung möglicher weiterer Induktoren für das <i>gbsAB</i> -Operon.....	58
1.1.2.3	Bestimmung der minimalen Induktorkonzentration .....	59
1.1.2.4	GbsR vermittelt die Cholininduktion des <i>gbsAB</i> -Operons .....	60
1.1.2.5	Auswirkung von Glycin Betain auf die <i>gbsAB</i> -Expression .....	61
1.1.2.6	Auswirkung von anderen kompatiblen Soluten auf die <i>gbsAB</i> -Expression.....	62
1.1.2.7	Unterbindung der Metabolisierung des Induktors Cholin.....	63
1.1.2.8	GbsR vermittelt die Repression des <i>gbsAB</i> -Operons durch Glycin Betain ....	64
1.1.2.9	Einfluss der Cholin- und Glycin Betain-Menge auf die <i>gbsAB</i> -Expression während des Wachstums .....	65
1.1.2.10	Ermittlung des minimalen für die Regulation des <i>gbsAB</i> -Operons wichtigen DNA-Abschnitts.....	67
2.	Experimentelle Charakterisierung von GbsR.....	69
2.1	Konstruktion eines Expressionsplasmides zur heterologen Überproduktion von GbsR aus <i>B. subtilis</i> in <i>E. coli</i> .....	69
2.2	Überexpression und Reinigung des GbsR-Proteins .....	70
2.3	Versuch der Größenbestimmung von GbsR.....	71
2.4	GbsR ist ein DNA-bindendes Protein .....	72
2.4.1	GbsR bindet an das identifizierte regulatorische <i>gbsAB</i> -Fragment.....	72
2.4.2	Eingrenzung der möglichen Bindestelle von GbsR .....	74
3.	Einfluss von GbsR auf OpuB und OpuC .....	75
3.1	GbsR vermittelt die Cholininduktion des OpuB-Aufnahmesystems .....	75
3.2	GbsR hat keinen Einfluß auf OpuC.....	76
3.3	Bestimmung der mRNA-Startpunkte des <i>opuB</i> -Transkriptes .....	78
4.	Identifizierung einer möglichen Bindebox für GbsR.....	79
4.1	EMSA der identifizierten möglichen Bindebox von GbsR.....	80
5.	GbsR bindet Cholin.....	83
6.	Bioinformatische Charakterisierung von GbsR .....	86
6.1	In silico-Analyse von GbsR .....	86
6.2	Datenbankanalyse zur Verbreitung und Organisation des GbsR Regulatorproteins anhand eines Sequenzvergleiches mit GbsR aus <i>Bacillus subtilis</i> .....	88
6.3	Analyse von GbsR mit Hilfe von Mj223 aus <i>M. jannaschii</i> .....	91
V.	Diskussion .....	95
1.	Die Regulation der Glycin Betain Synthese.....	95
1.1	Regulation der Glycin Betain Synthese in <i>E. coli</i> .....	96
1.2	Regulation der Glycin Betain Synthese in <i>B. subtilis</i> .....	98
1.2.1	GbsR reguliert die Gene für die Aufnahme von Cholin durch den ABC-Transporter OpuB und vermittelt die Cholininduktion des <i>gbsAB</i> -Operons .....	98
1.2.2	GbsR ist ein Repressorprotein mit einer Cholin-Bindedomäne .....	99
1.2.3	GbsR ist ein transkriptioneller Repressor.....	102
1.2.4	GbsR vermittelt die Repression des <i>gbsAB</i> -Operons durch Glycin Betain .....	107

1.2.4.1	Glycin Betain bindet mit niederer Affinität in kompetitiver Art mit Cholin an die Effektor-domäne von GbsR.....	110
1.2.4.2	Glycin Betain fungiert als chemisches Chaparon .....	111
2.	GbsR: eine neue Familie von transkriptionellen Repressoren .....	113
2.1	Die evolutionäre Verbreitung von GbsR-ähnlichen Proteinen innerhalb der Bakterien .....	113
2.2	Evolutionäre Entwicklung in <i>B. subtilis</i> .....	114
VI.	Literatur.....	117
VII.	Anhang .....	141

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Ausgewählte Vertreter kompatibler Solute .....	10
Abb. 2:	Modell des präferenziellen Ausschlusses zur Proteinstabilisierung durch kompatible Solute.....	14
Abb. 3:	Transportsysteme zur Aufnahme kompatibler Solute in <i>B. subtilis</i> mit ihren Substratspezifitäten .....	16
Abb. 4:	Unterschiedliche Glycin Betain Synthesewege.....	20
Abb. 5:	Glycin Betain Synthese in <i>B. subtilis</i> .....	22
Abb. 6:	Aufnahme von Cholin und Synthese von Glycin Betain in <i>B. subtilis</i> .....	23
Abb. 7:	Das Plasmid pDH1 .....	43
Abb. 8:	Das Plasmid pJMB1 .....	44
Abb. 9:	Das Plasmid pDH2 .....	44
Abb.10:	Das Plasmid pDH3 .....	45
Abb.11:	Das Plasmid pDH4 .....	45
Abb.12:	Das Plasmid pDH5 .....	46
Abb.13:	Primer Extension-Analyse der <i>gbsR-gbsAB</i> -Promotorregion .....	56
Abb.14:	Induktion des <i>gbsAB</i> -Operons .....	57
Abb.15:	<i>gbsAB</i> -Expression in Abhängigkeit verschiedener möglicher Induktoren.....	58
Abb.16:	Abhängigkeit der <i>gbsAB</i> -Induktion von der Cholinkonzentration.....	59
Abb.17:	Expression des <i>gbsA</i> -Gens unter verschiedenen Bedingungen .....	60
Abb.18:	Expression des <i>gbsA</i> -Gens unter verschiedenen Bedingungen .....	61
Abb.19:	Auswirkung von Cholin und Glycin Betain auf die <i>gbsAB</i> -Expression .....	62
Abb.20:	Auswirkung von kompatiblen Soluten auf die <i>gbsAB</i> -Expression .....	63
Abb.21:	<i>gbsAB</i> -Expression bei unterschiedlichen Mengen Cholin und Glycin Betain .....	65
Abb.22:	Übersicht der bereits vorhandenen und neu konstruierten <i>gbsA'-treA</i> -Fusionen zur Untersuchung der Regulation der <i>gbsAB</i> -Expression in <i>B. subtilis</i> .....	67
Abb.23:	SDS-PAGE der heterologen Überexpression und Reinigung des GbsR Proteins aus <i>B. subtilis</i> in <i>E. coli</i> .....	70
Abb.24:	Größenbestimmung von GbsR mittels Nativ-Gelelektrophorese.....	72
Abb.25:	EMSA des 100 bp <i>gbsAB</i> regulatorischen Fragmentes.....	73
Abb.26:	EMSA des 75 bp großen und 50 bp großen Fragmentes.....	74
Abb.27:	TreA-Aktivität der <i>B. subtilis</i> - Stämme GNB66 und GNB68 unter verschiedenen Bedingungen.....	76
Abb.28:	TreA-Aktivität der <i>B. subtilis</i> - Stämme GNB67 und GNB69 unter verschiedenen Bedingungen.....	77
Abb.29:	Primer Extension-Analyse der <i>opuB</i> -Promotorregion .....	79
Abb.30:	Ausschnitt aus den Alignments der Promotorregionen <i>gbsA</i> , <i>opuB</i> und <i>opuC</i> .....	80
Abb.31:	Das mögliche Bindemotiv des GbsR-Proteins .....	80
Abb.32:	EMSA der möglichen Bindebox von GbsR .....	82
Abb.33:	Gezeigt sind die Fluoreszenzspektren ohne und mit den jeweiligen Substraten....	85
Abb.34:	Hydrophobizitätsanalyse von GbsR nach Kyte und Doolittle .....	86
Abb.35:	Dargestellt ist die Vorhersage der Sekundärstruktur von GbsR .....	87
Abb.36:	GbsR mit möglichem HTH-Motiv .....	87
Abb.37:	Alignment der möglichen Helix-Turn-Helix-Motive.....	88
Abb.38:	Sequenzvergleiche GbsR-homologer Proteine.....	90
Abb.39:	Dargestellt sind die Nachbarregionen von GbsR und GbsR-ähnlichen Proteine...	91
Abb.40:	Alignment des GbsR-Proteins mit dem GbsR-homologen Protein aus <i>M. jannaschii</i> .....	92
Abb.41:	Sekundär-Strukturanalyse von Mj223 aus <i>M. jannaschii</i> .....	92
Abb.42:	Kristallstruktur von Mj223 und das Modell von GbsR.....	94

Abb.43:	Aufnahme und Oxidation von Cholin in <i>E. coli</i> .....	97
Abb.44:	Kristallstruktur von ChoX aus <i>S. meliloti</i> .....	101
Abb.45:	Sequenz von GbsR mit den eingezeichneten aromatischen Aminosäuren Phe, Tyr und Trp .....	102
Abb.46:	Helix-Turn-Helix-Motiv (A) und die Topologie der Winged Helix Faltung (B). .....	105
Abb.47:	Modell des Helix-Turn-Helix-Motives von GbsR .....	105
Abb.48:	Mj223 Homodimer Struktur.....	106
Abb.49:	Ausschnitt <i>B. subtilis</i> - Zelle .....	108
Abb.50:	Modell der Regulation der Glycin Betain Synthese in <i>B. subtilis</i> .....	109
Abb.51:	Nukleotidsequenz der <i>gbsAB</i> -Region aus <i>B. subtilis</i> .....	143
Abb.52:	DNA-Sequenz der TreA-Fusion des Stammes GNB52 .....	144
Abb.53:	DNA-Sequenz der TreA-Fusion des Stammes GNB53 .....	144
Abb.54:	DNA-Sequenz der TreA-Fusion des Stammes GNB54 .....	145
Abb.55:	DNA-Sequenz der TreA-Fusion des Stammes DHB4 .....	145
Abb.56:	DNA-Sequenz der TreA-Fusion des Stammes DHB5 .....	145
Abb.57:	Neighbourhood–Alignment von <i>gbsR</i> .....	153
Abb.58:	Sequenzvergleich GbsR-homologer Proteine .....	157



## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	<i>Escherichia coli</i> -Stämme .....	25
Tab. 2:	<i>Bacillus subtilis</i> -Stämme .....	26
Tab. 3:	Plasmide .....	27
Tab. 4:	Klonierungsprimer für die Überexpression von GbsR .....	28
Tab. 5:	Primer aus dem Bereich des <i>gbsAB</i> -Operons und <i>opuBA</i> -Operons aus <i>B. subtilis</i> .....	29
Tab. 6:	Primer für die Real-Time PCR .....	30
Tab. 7:	Zur Sequenzierung verwendete Primer .....	30
Tab. 8:	Primer für Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) .....	31
Tab. 9:	Vollmedium LB .....	32
Tab.10:	Minimalmedium A .....	32
Tab.11:	Spizizen's Minimalmedium (SMM) .....	32
Tab.12:	Spurenelementlösung 100 x .....	33
Tab.13:	Zusätze und Antibiotika .....	33
Tab.14:	Programm der qPCR .....	41
Tab.15:	Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele .....	50
Tab.16:	Bedingungen, unter denen eine Steigerung der Expression des <i>gbsAB</i> -Operons erreicht wird .....	64
Tab.17:	Identifizierung des minimalen, für die Regulation von <i>gbsAB</i> nötigen DNA- Abschnitts .....	68
Tab.18:	Die Tabelle zeigt die Verbreitung von GbsR und GbsR-ähnlichen Proteinen, die Verbreitung der Glycin Betain Synthese Gene sowie die Verbreitung der Aufnahmesysteme von Cholin bzw. Glycin Betain .....	116
Tab.19:	Aufgelistet sind die folgenden 50 GbsR-ähnlichen Proteine mit ihrer Zugangsnummer, ihrer Sequenzidentität zum GbsR aus <i>Bacillus subtilis</i> , Zugehörigkeit zum Organismus und ihrer Funktion bzw. der Annotation ihrer Funktion .....	146
Tab.20:	Transportsysteme für Cholin und Glycin Betain innerhalb der Art <i>B. anthracis</i> .....	154
Tab.21:	Transportsysteme für Cholin und Glycin Betain innerhalb der Art <i>B. cereus</i> ..	155
Tab.22:	Transportsysteme für Cholin und Glycin Betain innerhalb der Art <i>B. thuringiensis</i> .....	156

**Abkürzungen**

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>Amp<sup>r</sup></b>	resistent gegen Ampicillin
<b>APS</b>	Ammoniumperoxodisulfat
<b>bp</b>	Basenpaare (base pairs)
<b>Cml<sup>r</sup></b>	resistent gegen Chloramphenicol
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat
<b>FPLC</b>	fast protein liquid chromatography
<b>HTH</b>	Helix-Turn-Helix
<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid
<b>Kan<sup>r</sup></b>	resistent gegen Kanamycin
<b>kb</b>	Kilobasen-Paare
<b>Kap.</b>	Kapitel
<b>MCS</b>	multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)
<b>OD<sub>578</sub></b>	optische Dichte bei der Wellenlänge 578 nm
<b>ONPF</b>	2-methyl-6-(2-nitrophenoxy)oxane-3,4,5-triol
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>pNPG</b>	<i>para</i> - Nitrophenyl - $\alpha$ - D - Glucopyranosid
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
<b>SDS</b>	Natrium - Dodecylsulfat, Sodium – Dodecylsulfat
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
<b>Tet<sup>r</sup></b>	resistent gegen Tetracyclin

## I. Zusammenfassung

*Bacillus subtilis* ist ein Gram-positiver, stäbchenförmiger, mesophiler und fakultativ anaerober Mikroorganismus. Es besiedelt die oberen Bodenschichten und kann bei schlechten Umweltbedingungen als Übergangszustand Sporen bilden. Der Lebensraum von Bodenorganismen ist durch wechselnde Umweltbedingungen, wie z.B. Hitze, Trockenheit, Wasserverfügbarkeit und pH-Wert geprägt. Eine aktive Stressadaptation, welche es der Zelle ermöglicht schnell und gezielt auf Veränderungen der Umwelt zu reagieren, ist daher eine unabdingbare Voraussetzung für eine erfolgreiche Besiedlung eines solchen Lebensraumes. Ein weit verbreitetes Prinzip der Anpassung an wechselnde osmotische Umweltbedingungen ist die Akkumulation, durch Transport oder *de novo* Synthese, einer bestimmten Klasse niedermolekularer organischer Osmolyte, den so genannten kompatiblen Soluten. *B. subtilis* ist in der Lage das kompatible Solut Glycin Betain zu synthetisieren, wenn das Vorläufermolekül Cholin im umgebenden Medium vorhanden ist. Cholin wird über die beiden ABC-Transporter OpuB und OpuC in die Zelle aufgenommen und dort mit Hilfe der Enzyme GbsA und GbsB zu Glycin Betain oxidiert. Es ist bekannt, dass die Expression von *gbsA* und *gbsB* nicht osmotisch kontrolliert ist, sondern durch das Vorhandensein von Cholin induziert wird. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Gen *gbsR*, stromabwärts der *gbsAB*-Gene, für einen Repressor kodiert. GbsR induziert durch aktive Bindung von Cholin die Expression des *gbsAB*-Operons. Auch die Gene des Transporters OpuB, welcher den Transport von Cholin in die Zelle vermittelt, werden durch GbsR kontrolliert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Endprodukt Glycin Betain die Expression des *gbsAB*-Operons reprimiert. Dies geschieht durch einen negativen Feedback-Loop von Glycin Betain auf GbsR. Durch die duale Kontrolle der GbsR-Aktivität durch Cholin und Glycin Betain wird verhindert, dass das kompatible Solut Glycin Betain in übermäßigen Mengen angehäuft wird. Der Repressor GbsR wurde in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert, so konnte durch Bandshift-Analysen gezeigt werden, dass es sich tatsächlich um ein DNA-bindendes Protein handelt, dass spezifisch an Sequenzbereiche der intergenischen Region von *gbsAB*- und *opuB* bindet. Eine mögliche Operator-DNA, die ein Inverted Repeat, ein typisches Bindemotiv für transkriptionelle Regulatoren, enthält, konnte durch Verkürzungen der Promotorregion ermittelt werden. Durch bioinformatische Studien konnte ermittelt werden, dass GbsR in vielen *Bacillen* und *Staphylococcen* vorhanden ist und sich dort ebenfalls in der Nähe der Glycin Betain Synthese Gene befindet. Eine vorhandene Kristallstruktur eines GbsR-ähnlichen Proteins aus *Methanococcus jannaschii* ermöglichte überdies die Einteilung des GbsR Proteins in die Familie der Winged Helix-Turn-Helix Proteine.

## II. Einleitung

Mikroorganismen sind in fast allen natürlichen und künstlichen Lebensräumen zu finden. Sie sind auch in extremen Habitaten in der Lage zu existieren und sich zu vermehren. Ihre natürliche Umgebung ist durch Schwankungen einer Vielzahl von abiotischen und biotischen Faktoren geprägt, zu denen im Wesentlichen Nährstofflimitation, pH-Wert, hydrostatischer Druck, Wasserverfügbarkeit, Temperatur und Salzgehalt zählen (Wood *et al.*, 2001).

Eine aktive Stressadaptation, welche es der Zelle ermöglicht schnell und gezielt auf Veränderungen der Umwelt zu reagieren, ist daher eine unabdingbare Voraussetzung für eine erfolgreiche Besiedlung eines solchen Lebensraumes. Gezielte Anpassungsmechanismen sind in allen Domänen des Lebens konserviert (Roberts, 2005).

### 1. Die Auswirkung der Osmolarität auf die Bakterienzelle

Eine besondere Rolle spielt der Stress durch hohe oder wechselnde Osmolaritäten des umgebenden Mediums. Es gibt Mikroorganismen, die in ihrem Lebensraum ständig hohen Konzentrationen von osmotisch wirkenden Substanzen ausgesetzt sind. Diese finden wir zum Beispiel in Meerwasser und Salzseen (Ventosa *et al.*, 1998). Andere wiederum besiedeln die oberen Bodenschichten und sind damit mit ständig wechselnden osmotischen Bedingungen durch Überflutung oder Austrocknung konfrontiert (Galinski & Trüper, 1994; Miller & Wood 1996; Ventosa *et al.*, 1998).

Wasser ist eines der lebensnotwendigen Elemente, denn jeder Organismus besteht zum Großteil aus Wasser und benötigt dieses zum Überleben. Somit ist die Wasserverfügbarkeit ( $a_w$ ) und die damit verbundene Veränderung in Osmolarität und Salzgehalt in jedem speziellen Habitat für das Wachstum und das Überleben der Zelle von entscheidender Bedeutung. Die Wasserverfügbarkeit beinhaltet auch die Konzentrationen an gelösten Stoffen, wie Salze, Zucker, Aminosäuren und andere organische Osmolyte im Wasser (Madigan *et al.*, 2000, Grant, 2004) und ist somit limitierender Faktor für den Zellstoffwechsel und das Wachstum der Zelle (Galinski & Trüper, 1994; Csonka und Epstein, 1996; Wood, 1999; Bremer & Krämer, 2000).

Ein elementarer Vorgang in der Natur ist die Osmose, bei der Flüssigkeitsteilchen durch eine semipermeable Membran diffundieren, mit der Tendenz die Konzentrationsunterschiede gelöster Teilchen auf beiden Seiten auszugleichen. Die bakterielle Cytoplasmamembran ist semipermeabel und durchlässig für Wasser, Glycerin, Gase und kurzkettige Alkohole, aber undurchlässig für Makromoleküle, polare oder hydrophile Ionen und Moleküle (Galinski,

1993; Madigan *et al.*, 2000). Somit ist die bakterielle Zellmembran in Gram-negativen und gram-positiven *Bacteria*, sowie in *Archea* die wichtigste Abgrenzung zwischen dem Cytoplasma und der Umgebung.

Unter hypoosmolaren Bedingungen ist die Konzentration von osmotisch aktiven Substanzen im Cytoplasma höher als im umgebenden Medium. Das hat zur Folge, dass Wasser entlang des osmotischen Gradienten in die Zelle strömt und sich ein hydrostatischer Druck gegen die Zellwand gerichtet aufbaut, der so genannte Turgor. Die Aufrechterhaltung des Turgors ist notwendig für das Zellwachstum und die Zellteilung (Höltje, 1998; Koch, 1983).

Unter optimalen Bedingungen kann ein Zellinnendruck von circa 3-5 atm bei Gram-negativen Bakterien bzw. circa 15-20 atm bei Gram-positiven Bakterien gemessen werden (Csonka & Epstein, 1996). In der Natur muss die Bakterienzelle auf zwei Situationen besonders schnell reagieren können, um den Turgor in physiologische Grenzen halten zu können: osmotische „down-shifts“ und „osmotische upshifts“. Dies lässt sich anhand des Bodenhabitats besonders gut erläutern.

(i) Durch Regen kommt es zu einer Überflutung des Bodens, es entsteht eine hypoosmotische Umgebung. Dies bedeutet eine große Stresssituation für den Mikroorganismus (Wood, 1999; Hoffmann *et al.*, 2001). Durch die schnelle Verdünnung der Substanzen im Boden, diffundiert Wasser von außen durch die Cytoplasmamembran in die Zelle. Der Turgor steigt und es besteht die Gefahr des Platzens der Zelle. Um dies zu verhindern, besitzen einige Mikroorganismen mechanosensitive Kanäle. In *B. subtilis* haben die mechanosensitiven Kanäle MscL und MscS die Aufgabe, osmotisch wirksame Schutzsubstanzen unselektiv aus der Zelle sehr rasch auszuschleußen (Hoffmann *et al.*, 2008).

(ii) Durch Hitze hingegen verdunstet das Bodenwasser und die Konzentration von osmotisch wirksamen Substanzen in der Umgebung steigt deutlich an. Das Wasser hat nun das Bestreben aus der Zelle raus zu diffundieren, was zur Folge hat, dass es zur Plasmolyse kommt, die mit dem Zusammenbruch des Zellinnendrucks einhergeht.

Für das Wachstum und das Überleben von Mikroorganismen ist die Entwicklung von Strategien zur Anpassung an extreme und schwankende Osmolaritäten essentiell.

## 2. Adaptation von Mikroorganismen an hochosmolare Bedingungen

Der Fluss von Wasser über die Membran kann nicht nur osmotisch erfolgen, in einigen Mikroorganismen gibt es spezielle Wasserkanäle, so genannte Aquaporine. Ein solcher Kanal (AqpZ) wurde zum Beispiel in *E.coli* gefunden (Calamita *et al.*, 1995). Aquaporine sind Kanäle, die den Durchtritt des Wassers in beide Richtungen durch die Membran erleichtern. In *B. subtilis* konnten bisher keine solcher Kanäle identifiziert werden (Holtmann *et al.*, 2004).

In Mikroorganismen gibt es keinen aktiven Wassertransport, die Regelung des Wassereinzugs bzw. Wasserausstroms erfolgt demnach durch das osmotische Potential des Cytoplasmas der Zelle (Kempf & Bremer, 2000; Bremer, 2002).

Halophile Bakterien können durch die Akkumulation von Ionen in ihrem hypersalinen Lebensraum existieren (Galinski, 1993; Ventosa *et al.*, 1998; Kempf & Bremer, 2000; Oren, 2008). Diese Art der Adaptation wird „salt-in“- Strategie genannt (Galinski & Trüper, 1994; Kempf & Bremer, 2000).

Viele halotolerante Mikroorganismen, wie z.B. das Gram-positive Bodenbakterium *B. subtilis*, haben eine andere Strategie zur Anpassung gefunden. Sie akkumulieren osmotisch aktive Substanzen, so genannte kompatible Solute (Galinski, 1993; da Costa *et al.*, 1998; Bremer, 2002). Diese Strategie bezeichnet man als „salt-out“- Strategie (Galinski & Trüper, 1994; Kempf & Bremer, 2000).

### 2.1 „salt-in“- Strategie

Diese Strategie ist hauptsächlich bei halophilen Mikroorganismen zu finden, die sich an stetig hochosmolare Bedingungen angepasst haben. Zu diesen gehören sowohl halophile Bacteria wie z.B. *Haloanaerobiales* und *Silicibacter ruber* als auch Archaea wie z.B. *Halobacteria* (Grant, 2004). Um dem Efflux des Wassers entgegen zu wirken, werden  $K^+$  und  $Cl^-$ , also anorganische Ionen, in hohem Maße akkumuliert. Diese Mikroorganismen weisen eine sehr hohe molare Konzentration (bis 5 M) dieser Salze in der Zelle auf, was voraussetzt, dass alle metabolischen und regulatorischen Prozesse dieser Organismengruppe an die hohe Ionenkonzentration in der Zelle adaptiert sind. So sind vor allem saure Aminosäuren, wie Aspartat und Glutamat, und schwach hydrophobe Aminosäuren in der Aminosäuresequenz der Proteine zu finden (Lanyi, 1974; Dennis & Shimmin, 1997; Sleator & Hill, 2002). Die Proteinoberfläche hat so eine höhere negative Ladung, welche die Kationen in der Zelle

anzieht (Sleator & Hill, 2002; Zaccai *et al.*, 1989). Man geht davon aus, dass diese Stärkung der Hydrathülle in Lebensräumen mit geringer Wasseraktivität das Überleben sichert.

Diese Art der Strategie scheint sehr erfolgreich bei der Anpassung an extreme Salzkonzentrationen zu sein, ist aber im Hinblick auf die Habitate recht unflexibel, denn diese Organismen sind auf Lebensräume, wie Salzseen und Salinen, beschränkt, bei denen die Salzkonzentrationen relativ gleich bleiben.

## 2.2 „salt-out“- Strategie

Diese Strategie findet man in halotoleranten Bakterien, wie in *B. subtilis*. Die Bezeichnung „salt-out“ ist auf den aktiven Transport von anorganischen Ionen aus dem Cytoplasma heraus zurück zu führen. Es werden osmotische Schutzsubstanzen, sogenannte kompatible Solute, durch hoch affine Transportsysteme oder durch *de novo* Synthese im Cytoplasma akkumuliert (Galinski & Trüper, 1994; Csonka & Epstein, 1996; Miller & Wood, 1996; Bremer, 2002). Kompatible Solute interferieren nicht mit dem zentralen Stoffwechsel und können deshalb auch in hohen Konzentrationen akkumuliert werden. Durch diese Art der Adaptation sind Bakterien im Hinblick auf die Wahl ihres Lebensraumes deutlich flexibler (Bremer, 2002). Die Osmoprotektion durch die Akkumulation von kompatiblen Soluten ist ein konservierter Anpassungsmechanismus, der nicht nur von Mikroorganismen (Bacteria, Archaea, Eucarya) sondern auch von Pilzen, Pflanzen, tierischen und menschlichen Zellen genutzt wird (Rhodes & Hanson, 1993; Galinski & Trüper, 1994; Bohnert *et al.*, 1995; Gutierrez *et al.*, 1995; Csonka & Epstein, 1996; Hagemann *et al.*, 1997; da Costa *et al.*, 1998; Peter *et al.*, 1998; Nakayama *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2000; Holtmann, 2002; Kuhlmann & Bremer, 2002; Burg & Ferraris, 2008).

## 3. Osmoregulation in halotoleranten Bakterien am Beispiel von *B. subtilis*

*Bacillus subtilis* ist ein Gram-positives, stäbchenförmiges, fakultativ anaerobes und mesophiles Bakterium. Es ist peritrich begeißelt und bildet Endosporen. Aufgrund seiner ubiquitären Verbreitung in den oberen Bodenschichten und seines komplett sequenzierten Genoms dient *B. subtilis* als Modellorganismus für Gram-positive Mikroorganismen. Die Osmoadaptation bei Bodenbakterien wird vor allem in *B. subtilis* studiert (Kempf & Bremer, 1998). Als Mikroorganismus der oberen Bodenschicht ist *B. subtilis* besonders stark von Fluktuationen der externen Salzkonzentrationen betroffen (Miller & Wood, 1996). Daher sind

Adaptationen an diese wechselnden Bedingungen für die Besiedlung solcher Habitate essentiell. Durch Austrocknung des Bodens kommt es im Lebensraum von *B. subtilis* zu hypersalinen Bedingungen. Um solche extremen Umweltbedingungen zu bewältigen, bestände für *B. subtilis* als Endosporenbildner die Möglichkeit der Sporulation. Allerdings scheint die Sporulation aber nicht die bevorzugte Anpassungsreaktion von *Bacilli* an hochosmolare Bedingungen zu sein, da der mehrstufige Prozess der Sporulation unter Salzstress in Phase II abbricht. Die Aktivierung der frühen Sigmafaktoren  $\sigma^E$  und  $\sigma^F$  wird unter diesen Bedingungen blockiert und die Sporulationskaskade unterbrochen (Ruzal *et al.*, 1998). Somit muss sich *B. subtilis* als vegetative Zelle an die hochosmolare Bedingungen anpassen. Eine Alternative bei ständiger Präsenz als vegetative Zelle stellen dazu bakterielle Stressantworten dar, die das Überleben und Wachstum unter verschiedenen Stressbedingungen, wie Hitze-, Ethanol-, Säure-/Alkalistress, Nährstoffmangel, Sauerstofflimitation, oder einer erhöhten Salzkonzentration erlauben (Hecker *et al.*, 1996; Bernhardt *et al.*, 1997; Völker *et al.*, 1999; Hecker & Völker, 2001). Generelle Stressantworten vermitteln einen allgemeinen Schutz gegenüber verschiedenen Umwelteinflüssen unabhängig vom auslösenden Stressfaktor. Die transiente Expression der Gene genereller Stressregulone unterliegt dabei der Kontrolle eines oder mehrerer Regulatoren (Hecker & Völker 1998; Völker *et al.*, 1999). Das generelle Stressregulon in *Bacillus subtilis* wird durch den alternativen Transkriptionsfaktor SigB ( $\sigma^B$ ) gesteuert, und kontrolliert, direkt oder indirekt, wahrscheinlich mehr als 150 Gene in *B. subtilis* (Petersohn *et al.*, 2001; Price *et al.*, 2001; Brigulla *et al.*, 2003). Unabhängig von der generellen Stressantwort wird je nach Stressart eine spezifische Stressantwort induziert (Petersohn *et al.*, 2001; Brigulla *et al.*, 2003; Holtmann *et al.*, 2004). Das Zusammenspiel zwischen genereller und spezifischer Stressantwort gewährleistet die effiziente Adaption der Zellen an verschiedene Arten von Stress (Hengge-Aronis, 1999). Die generelle Stressanpassung in Gram-positiven Bakterien ist auf physiologischer Ebene eng verwandt mit der Stressantwort, die vom alternativen Transkriptionsfaktor RpoS in Gram-negativen Bakterien vermittelt wird (Hengge-Aronis, 1996; Loewen *et al.*, 1998). Proteom-Analysen haben gezeigt, dass die durch einen plötzlichen Anstieg der Osmolarität induzierten Proteine in zwei Gruppen, die salzspezifischen und die generellen Stressproteine, unterteilt werden können (Bernhardt *et al.*, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass die Überlebensfähigkeit einer *sigB* Mutante nach einem plötzlichen, wachstumslimitierenden Salzschock deutlich eingeschränkt ist (Völker *et al.*, 1999). Direkt nach einem hyperosmotischen Schock sorgt  $\sigma^B$  für die transiente Expression der Gene *opuD* und *opuE*, welche für Transporter zur Aufnahme osmotischer



Schutzsubstanzen codieren. In hochosmolar adaptierten *B. subtilis* Zellen erfolgt die Transkription beider Gene nicht  $\sigma^B$  abhängig, sondern spezifisch osmotisch reguliert, solange der Stimulus andauert (von Blohn *et al.*, 1997; Spiegelhalter & Bremer, 1998). Plötzliche, extreme Salzschocks und das Wachstum unter lang anhaltend hochosmolaren Bedingungen stellen offensichtlich unterschiedliche Anforderungen an die Stressreaktion der Zelle, denen sie zum einen mit der Anschaltung der generellen Stressantwort, zum anderen mit für osmotischen Stress spezifischen Anpassungsreaktionen, wie der Akkumulation kompatibler Solute, begegnet. Das SigB-Regulon bietet eine schnelle, aber meist transiente Antwort, während andere Sigma-Faktoren, wie z. B.  $\sigma^A$ , so lange aktiv bleiben wie der Stimulus andauert. Proteom- und Northern-Analysen in *B. subtilis* zeigten aber auch, dass unter Hitzestress und bei suboptimaler Wachstumstemperatur  $\sigma^B$  kontrollierte Gene kontinuierlich induziert sind (Brigulla *et al.* 2003; Holtmann *et al.* 2004). So haben auch viele Gene für die *de novo* Biosynthese osmotischer Schutzsubstanzen Promotoren, die von  $\sigma^A$  erkannt werden (Brill, 2001; Kuhlmann, 2002; Kuhlmann & Bremer, 2002).

### 3.1 Erste Phase: Akkumulation von $K^+$ -Ionen

Kalium-Ionen sind die am häufigsten vorkommenden Kationen im Cytoplasma und dienen, als eine der wichtigsten intrazellulären Osmolyte, der Aufrechterhaltung des Turgors (Csonka, 1989). In *B. subtilis* erfolgt die Osmoadaptation in einer zweistufigen Anpassungsreaktion. Ist *B. subtilis* einem plötzlichen Anstieg der Salzkonzentrationen im umgebenden Medium und dem damit verbundenem Verlust von Zellwasser ausgesetzt, so erfolgt eine rasche Akkumulation von Kalium-Ionen aus der Umwelt (Whatmore *et al.*, 1990). Werden Zellen mit einem Anstieg der Salzkonzentration von 0 M auf 0,4 M konfrontiert, so steigt die intrazelluläre Kaliumkonzentration binnen einer Stunde von circa 350 mM auf circa 650 mM an (Whatmore *et al.*, 1990). Die Aufnahme der Kalium-Ionen aus dem Medium in die Zelle erfolgt über spezifische Kalium-Transportsysteme (Ktr), die sowohl in Mikroorganismen wie auch in Pflanzen gefunden werden konnten. Das System besteht aus zwei Komponenten, einem Transmembranprotein (KtrB), das einen Kaliumkanal entspricht, und einem membranassoziierten Protein (KtrA), das einem regulatorischen Protein entspricht, welches durch Bindung von Liganden die Aktivität des Kalium-Kanals reguliert (Holtmann *et al.*, 2004; Albright *et al.*, 2007).

In *B. subtilis* erfolgt die Aufnahme der Kalium-Ionen über das Transportsystem KtrAB ( $K_m = 1,2$  mM) und über das niedrig affine Transportsystem KtrCD ( $K_m = 12$  mM) (Holtmann *et al.*, 2003). Die Kaliumaufnahme über die Ktr-Systeme ist ein wichtiger Teil der Adaptation nach

einem hyperosmolaren Schock, aber auch bei stetigem Wachstum unter hochosmolaren Bedingungen, denn fehlt das KtrAB- System, so kann *B. subtilis* nach einem solchen Schock nicht mehr wachsen (Holtmann *et al.*, 2003).

Die Akkumulation von Kalium-Ionen ist notwendig um den Zellinnendruck wiederherzustellen. Um die positive Nettoladung auszugleichen, ist die Akkumulation eines Gegenions nötig. In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass Glutamat die Funktion als Gegenion erfüllt (Cayley *et al.*, 1991; McLaggan *et al.*, 1994). Dieser Sachverhalt wurde auch für *B. subtilis* vermutet, allerdings konnte nach einem osmotischen Schock kein Anstieg des Glutamatlevels in der Zelle festgestellt werden (Whatmore *et al.*, 1990). Eine hoher intrazellulärer Kaliumspiegel führt dazu, dass das Cytoplasma alkalysiert wird (Krulwich *et al.*, 2001) und damit essentielle Vorgänge wie die Proteinbiosynthese gestört werden (Kempf & Bremer, 1998; Holtmann *et al.*, 2003). Aus diesem Grund erfolgt nun der zweite Schritt der Osmoanpassung, die Akkumulation von kompatiblen Soluten.

### 3.2 Zweite Phase: Akkumulation von kompatiblen Soluten

Kompatible Solute ersetzen die angehäuften Kalium-Ionen und können in höheren Konzentrationen akkumuliert werden, da sie nicht mit dem Stoffwechsel interferieren (Whatmore *et al.*, 1990). Es stehen grundsätzlich zwei Mechanismen zur intrazellulären Anhäufung zur Verfügung, zum einen die Aufnahme von exogenen Soluten aus der Umgebung und zum anderen die endogene *de novo* Synthese dieser Solute (Csonka und Epstein, 1996; Holtmann *et al.*, 2003).

In *B. subtilis* wurden bisher fünf Systeme identifiziert und charakterisiert, die die Aufnahme von kompatiblen Soluten vermitteln. Hierbei handelt es sich um die Opu-Transportsysteme (osmoprotectant uptake) OpuA, B, C, D und OpuE (Abb.3) (Kempf & Bremer, 1998). Zu den zwölf bisher bekannten kompatiblen Soluten in *B. subtilis* zählen unter anderem Prolin, Glycin Betain, Carnitin, Cholin-O-Sulfat und Ectoin (Kempf & Bremer, 1995; Kappes *et al.*, 1996; von Blohn *et al.*, 1997; Kappes *et al.*, 1999).

Glycin Betain, eines der wichtigsten kompatiblen Solute in *B. subtilis*, wird mit Hilfe der Glycin Betain-Synthesegene *gbsA* und *gbsB* aus dem Vorläufermolekül Cholin, das über die ABC-Transporter OpuB und OpuC aufgenommen werden kann, synthetisiert (Boch *et al.*, 1996). Über eine endogene *de novo* Synthese ist dieser Mikroorganismus in der Lage große Mengen Prolin aus dem Vorläufer Glutamat herzustellen und zu akkumulieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Herstellung von Prolin durch die Enzyme ProH, ProJ und ProA

vermittelt wird und dass ein proportionaler Zusammenhang zwischen der Osmolarität des Mediums und der akkumulierten Prolinmenge besteht (Brill, 2002). Die *proHJ*-Gene sind die am meisten Salz-induzierten Gene in *B. subtilis* (Steil *et al.*, 2003). Überdies kann *B. subtilis* durch die Hydrolyse von aufgenommenen prolinhaltigen Di- und Tripeptiden Prolin akkumulieren (Brill, 2002; Barzantny, 2008).

#### 4. Kompatible Solute

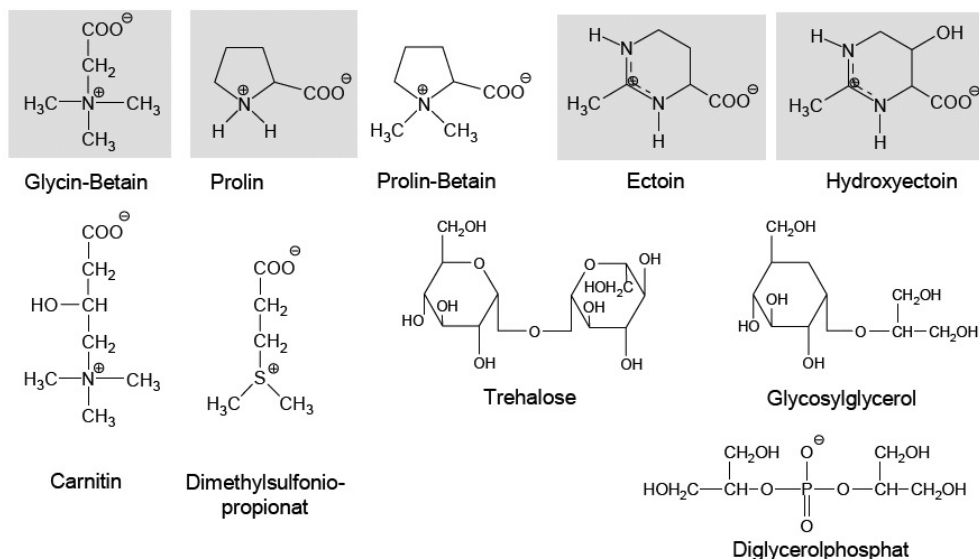
Es gibt eine Vielzahl verschiedener kompatibler Solute in der Natur durch deren Akkumulation das Überleben und das Wachstum unter verschiedenen Stressbedingungen ermöglicht wird (Kempf & Bremer, 1998; Bremer & Krämer, 2000; Wood *et al.*, 2001; Holtmann *et al.*, 2003). Kompatible Solute sind kleine, leicht lösliche, organische Moleküle, die bei einem physiologischen pH-Wert keine Nettoladung tragen, d.h. sie liegen demnach bei *Bacteria* als Zwitterion oder ungeladen vor (Galinski, 1995). Diese Solute können bis zu molaren Konzentrationen in der Zelle angehäuft werden, ohne einen negativen Einfluss auf den zellulären Stoffwechsel, die Proteinfaltung, die Membranintegrität oder die Zellteilung zu haben (Brown, 1976; Le Rudulier *et al.*, 1984; Kaasen *et al.*, 1994). Aufgrund der Tatsache, dass diese organischen Osmolyte vielfach metabolisch inert sind, und in der Zelle schnell auf- und abreguliert werden können ohne den zentralen Metabolismus zu stören, erhielten sie den Namen kompatible Solute (Brown & Simpson, 1972; Yancey *et al.*, 1982; Yancey, 2005).

Die Akkumulation kompatibler Solute als Schutz gegen hyperosmotischen Stress ist in allen drei Domänen des Lebens vertreten (Kempf & Bremer, 1998; Roberts, 2005; Burg & Ferraris, 2008). Das Spektrum der verwendeten Solute ist auf vier Stoffklassen beschränkt (Abb.1) (Miller & Wood, 1996; Kempf & Bremer, 1998; Bremer & Krämer, 2000; Grant, 2004; Holtmann *et al.*, 2004).

Zu diesen Stoffklassen zählen:

1.  $\alpha$ - und  $\beta$ - Aminosäuren und deren Derivate
  - a) Aminosäuren, wie Prolin, Glutamin und Glutamat
  - b) Tetrahydropyrimidine, Ectoin und Hydroxyectoin
  - c) N-acetylierte Aminosäuren
  - d) Glutamin-Amid Derivate
  - e) Kleine Peptide
2. Zucker, Heteroside und Pyrole
  - a) Zucker, wie Trehalose und Saccharose

- b) Zuckerderivate, wie Glycosylglycerol und Sulphotrehalose
  - c) Polyole, wie Glycerol und Mannitol
- 3. Tri-Methyl-Ammonium- Verbindungen, wie z.B.
  - a) Glycin Betain
  - b) Cholin
  - c) Carnitin
- 4. Methylsulfoniumverbindungen und Sulfatester, wie z.B.
  - a) Cholin-O-Sulfat
  - b) Dimethylsulfoniumpropionat
  - c) Dimethylsulfoniumacetat



**Abbildung 1. Ausgewählte Vertreter kompatibler Solute**

Die in *B. subtilis* und nah verwandten Species synthetisierten kompatiblen Solute sind grau unterlegt (Madigan *et al.*, 2000; Santos & da Costa, 2002, Bremer, 2002, Bursy *et al.*, 2007).

Die Akkumulation von kompatiblen Soluten kann sowohl durch die Aufnahme exogen vorliegender Substanzen als auch über die endogene *de novo* Synthese erfolgen (Csonka und Epstein, 1996; Holtmann *et al.*, 2004). Oft kann ein breites Spektrum exogener, vorgefertigter Substanzen aufgenommen werden, während die Möglichkeiten zur *de novo* Synthese sich meist auf ein oder zwei kompatible Solute beschränkt.

Glycin Betain z.B. ist eines der wichtigsten und am meisten genutzten kompatiblen Solute in der Natur (Courtenay *et al.*, 2000). Es kann von *B. subtilis* über die Transportsysteme OpuA,

OpuC oder OpuD aufgenommen oder aus dem Vorläufermolekül Cholin synthetisiert werden (Boch *et al.*, 1996).

Man findet Glycin Betain als Osmoprotectivum in Bakterien, Archaeen, Pflanzen und sogar in tierischen und menschlichen Zellen. Auch Ectoin und Hydroxyectoin sind als osmotische Schutzsubstanzen weit verbreitet, so findet man Aufnahmesysteme dafür in *B. subtilis* (Jebbar *et al.*, 1995), *E. coli*, *C. glutamicum* (Csonka & Epstein, 1996; Bremer & Krämer, 2000) und in halophilen Bakterien wie *Halomanas elongata* und *Virgibacillus pantothenicus* (Gramman *et al.*, 2002; Kuhlmann & Bremer, 2002).

Die meisten kompatiblen Solute in *Bacteria* und *Eukarya* sind biologisch, chemisch und physikalisch stabil und üben eine indirekte Interaktion mit Proteinen aus (Csonka, 1989). Sie bewirken in der Zelle eine Stabilisierung der Proteine und anderen Zellkomponenten, wie z.B. der Zellmembran (Hinch & Hagemann, 2004) und verhindern so deren Denaturierung durch hohe ionische Konzentrationen im Cytoplasma („preferential exclusion model“, Kapitel II.4.1).

Auch in Archaea hat man sich der Erforschung der Stressantwort auf hyperosmolare Wachstumsbedingungen angenommen. Wie *Eubacteria* sind auch *Archaea* in der Lage kompatible Solute aus ihrer Umwelt aufzunehmen und/ oder endogen *de novo* zu synthetisieren (Müller *et al.*, 2005). Die von *Archaea* bevorzugten kompatiblen Solute gleichen in ihrer Basisstruktur und in ihren Eigenschaften denen der *Bacteria* und *Eukarya*. Allerdings besitzen diese bei einem physiologischen pH-Wert eine negative Nettoladung (Roberts, 2005). Man geht davon aus, dass die negativ geladenen Solute als Gegenion zu den hohen intrazellulären Konzentrationen an positiven Kalium-Ionen verwendet werden (Martin *et al.*, 1999, Roberts, 2005). Auch hier lassen sich die kompatiblen Solute in zwei chemische Gruppen teilen: 1. in Zucker und Pyrole und 2. in Aminosäuren und deren Derivate (Pflüger & Müller, 2004). Beispiele für ausschließlich archaelle kompatible Solute sind 2-O-D-Mannosyl-D-Glycerat, Diglycerolphosphat,  $\alpha$ -Glucosylglycerat,  $\beta$ -Glutamat,  $\beta$ -Glutamin und N $\epsilon$ -Acetyl- $\beta$ -Lysin, Di-*myo*-1,1'-Inositolphosphat und zyklisches 2,3 Biphosphoglycerat (Pflüger *et al.*, 2003).

Kompatible Solute fungieren nicht ausschließlich als Protektivum bei hochosmolaren Wachstumsbedingungen, sie können die Zelle auch vor anderen Stressfaktoren, wie z.B. hohe und niedrige Temperatur, Einfrier- und Auftauprozesse und Austrocknung schützen (Lippert & Galinski, 1992; Welsh, 2000).

So wirkt zum Beispiel Ectoin in *V. pantothenicus* osmo- und kälteprotektiv (Kuhlmann, 2002; Kuhlmann *et al.*, 2008). Auch Glycin Betain zeigt in den Mikroorganismen *Listeria*

*monocytogenes* (Bayles und Wilkinson, 2000) und *B. subtilis* (Brigulla *et al.*, 2003; T. Hoffmann, persönliche Mitteilung) kälteprotektive Wirkung. Glycin Betain ist zudem auch als Thermoprotektivum in *Archeoglobus fulgidus*, einem hyperthermophilen und *B. subtilis*, einem mesophilen Mikroorganismus, beschrieben (Holtmann *et al.*, 2003; Holtmann & Bremer, 2004).

Kompatible Solute haben neben ihrer Eigenschaft der Hydrierung der Zelle auch proteinstabilisierende Eigenschaften, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Lippert & Galinski, 1992; Diamant *et al.*, 2003; Arora *et al.*, 2004). Das heißt, kompatible Solute können Proteine vor der Denaturierung schützen. Aufgrund dieser proteinstabilisierenden Eigenschaften werden diese kompatiblen Solute auch als „chemical chaperones“ bezeichnet (Diamant *et al.*, 2001, 2003). Aus diesem Grund finden kompatible Solute in verschiedenen industriellen Produkten Anwendung (Roberts, 2005). Ectoin zum Beispiel schützt die Haut vor Stressfaktoren wie UV-Strahlung (Bünger & Driller, 2004), Trockenheit, Hitze oder Kälte und ist deshalb Inhaltsstoff verschiedenster Kosmetika und Hautpflegeprodukte.

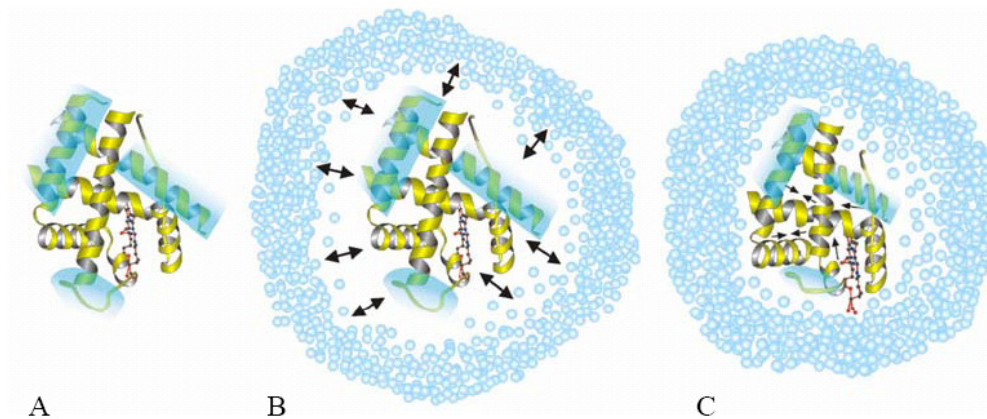
Auch wird Ectoin bei der Optimierung der PCR eingesetzt (bitop AG, Witten, Deutschland). Hat man GC-reiche DNA-Abschnitte und somit eine hohe Schmelztemperatur, erleichtert Ectoin die Amplifikation durch die Stabilisierung der Polymerase (Schnoor *et al.*, 2004). Die Versalzung von landwirtschaftlichen Nutzflächen nimmt immer weiter zu. In solchen von zunehmender Versalzung bedrohten Anbaugebieten besteht ein großes ökonomisches Interesse an der Entwicklung von transgenen salztoleranten Kulturpflanzen (Wood, 2003). Glycin Betain kommt in vielen wilden Pflanzenarten vor, die einen hohen Grad an Dürre- oder Salzverträglichkeit aufweisen. Auch einzelne Kulturpflanzen wie zum Beispiel Zuckerrüben und Baumwolle sind zur Bildung von Glycin Betain befähigt. In den meisten stressempfindlichen Kulturpflanzen wie dem Grossteil der Gemüse- und Fruchtarten werden jedoch keine nennenswerten Mengen an osmoprotektiven Substanzen produziert. So konnte der Transfer eines Gens für die Cholin-Oxidase, welche die Oxidation von Cholin zu Glycin Betain katalysiert, in die Pflanze *Arabidopsis thaliana* die Salz- und Hitzetoleranz dieser Pflanze steigern (Alia *et al.*, 1998). Auch bei Tabakpflanzen gelang es die *bet*-Gene für die Glycin Betain Synthese aus *E. coli* in das Genom zu integrieren (Holstrom *et al.*, 2000). Die Pflanzen zeigten eine leicht erhöhte Toleranz gegenüber Salzstress. Ebenso findet Glycin Betain in der Industrie als Glycin Betain-Wasser-Lösung Anwendung als Wärmeübertrager (B.P.M. Willems, Marketing & Technology Consult BV, Niederlande, J. Jokinen, Fortum Oil Oy, Finland).

#### 4.1 Wirkungsweise kompatibler Solute

Kompatible Solute schützen die Zelle auf zwei Arten vor hyperosmolarem Stress (Kempf & Bremer, 1998). Zum einen verringern sie durch ihre schnelle Akkumulation zu molaren Konzentrationen die osmotische Potentialdifferenz zwischen Zelle und der Umgebung. Dadurch verringert sich der Wasserausstrom und der Zellinnendruck wird aufrechterhalten. Die Menge an freiem cytoplasmatischem Wasser ist eine wichtige Determinante für das Zellwachstum (Cayley *et al.*, 1992). Kompatible Solute wie zum Beispiel Glycin Betain oder Prolin erhöhen die Menge an freiem Wasser in der Zelle und vergrößern somit das Volumen des Cytoplasmas (Record *et al.*, 1998).

Zum anderen wirken kompatible Solute als Stabilisatoren für Proteine und andere Zellkomponenten, die aufgrund der hohen Ionenstärke zu denaturieren drohen. Die exakten biochemischen Mechanismen, auf welchen die Wirkung der kompatiblen Solute beruht, sind auch heute noch nicht vollständig verstanden (Kempf & Bremer, 1998).

Zur Erklärung der Effekte wird das „preferential exclusion“-Modell von Arakawa und Timasheff herangezogen (Arakawa & Timasheff, 1985), welches besagt, dass diese kompatiblen Solute aus der Hydrathülle von Proteinen ausgeschlossen werden und dadurch stabilisierend auf die Hydrathülle von Proteinen und anderen Makromolekülen wirken (Abb. 2). Dieses Modell beruht darauf, dass aufgrund von Kräften, ähnlich hydrophoben Wechselwirkungen, kompatible Solute von der Umgebung des Peptidrückgrates ausgeschlossen werden. Die Kräfte werden als osmophobe Wechselwirkungen bezeichnet (Bolen & Baskakov, 2001). Durch den Ausschluss der Solute aus der Hydrathülle des Proteins, kommt es zu einer nicht homogenen Verteilung der Solute im Cytoplasma. Es erfolgt eine Erniedrigung der Entropie und daraus resultiert ein thermodynamisches Ungleichgewicht. Dieses Ungleichgewicht erzeugt eine thermodynamische Kraft, d.h. die kompatiblen Solute versuchen sich möglichst gleichmäßig in der Zelle zu verteilen und üben damit einen Druck auf die im Cytoplasma vorhandenen Moleküle aus, der das Protein in eine möglichst kompakte Konformation drängt, und somit die native Struktur des Proteins stabilisiert (Street *et al.*, 2006; Ignatova & Gierasch, 2006; Burg & Ferraris, 2008).



**Abbildung 2: Modell des präferenziellen Ausschlusses zur Proteinstabilisierung durch kompatible Solute.** In (A) ist die modellhafte Tertiärstruktur eines nativen Proteins mit seiner Hydrathülle im ungestressten Zustand dargestellt; (B) Unter Stress denaturierendes Protein. Kompatible Solute sind als Kugeln dargestellt und werden aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften von der direkten Hydrathülle ausgeschlossen, was zu einer ungleichmäßigen Verteilung im Cytoplasma führt; (C) Um diese energetisch ungünstige Verteilung zu minimieren, nimmt das Protein eine möglichst kompakte Form ein, die dem nativen Protein (A) sehr ähnelt. [(Arakawa & Timasheff, 1985; Bolen & Baskakov, 2001), Bildquelle: bitop AG, Witten, Deutschland; (www.bitop.de)]

## 5. Die Aufnahme von kompatiblen Soluten in *B. subtilis*

Die unterschiedlichen Habitate von *B. subtilis* bieten ihm ein weites Spektrum an exogen vorgeformten kompatiblen Soluten, welche durch Wurzelexudate, verrottetes Pflanzenmaterial oder den Abbau von mikrobiellen und tierischen Zellen in das Ökosystem gelangen (Welsh, 2000; Bremer, 2002). Die Aufnahme von kompatiblen Soluten aus der Umwelt wird meistens der energieaufwendigeren *de novo* Synthese vorgezogen (Dinnbier *et al.*, 1988; Oren, 2008).

Im natürlichen Ökosystem variiert zum einen sowohl das Angebot an osmoprotektiv wirkenden Substanzen als auch das Angebot der Vorläufer für deren Synthese. Zum anderen kommen diese meist nur in sehr niedrigen Konzentrationen vor. Die Konzentrationen liegen üblicherweise im nanomolaren bis mikromolaren Bereich (Kiene *et al.*, 1998). Aus diesem Grund weisen die Transporter für Osmoprotektiva eine hohe Affinität zu ihren wichtigsten Substraten auf und ihre Transportkapazität ist so ausgerichtet, dass sie eine schnelle cytoplasmatische Akkumulation von kompatiblen Soluten bis hin zu molaren Konzentrationen erlauben. Um einen Vorteil von dem Spektrum an verfügbaren Osmoprotektiva in der Umgebung zu haben, besitzen Mikroorganismen meist verschiedene Aufnahmesysteme, darunter auch solche die ein breites Spektrum an Substraten transportieren können (Bremer & Krämer, 2000).

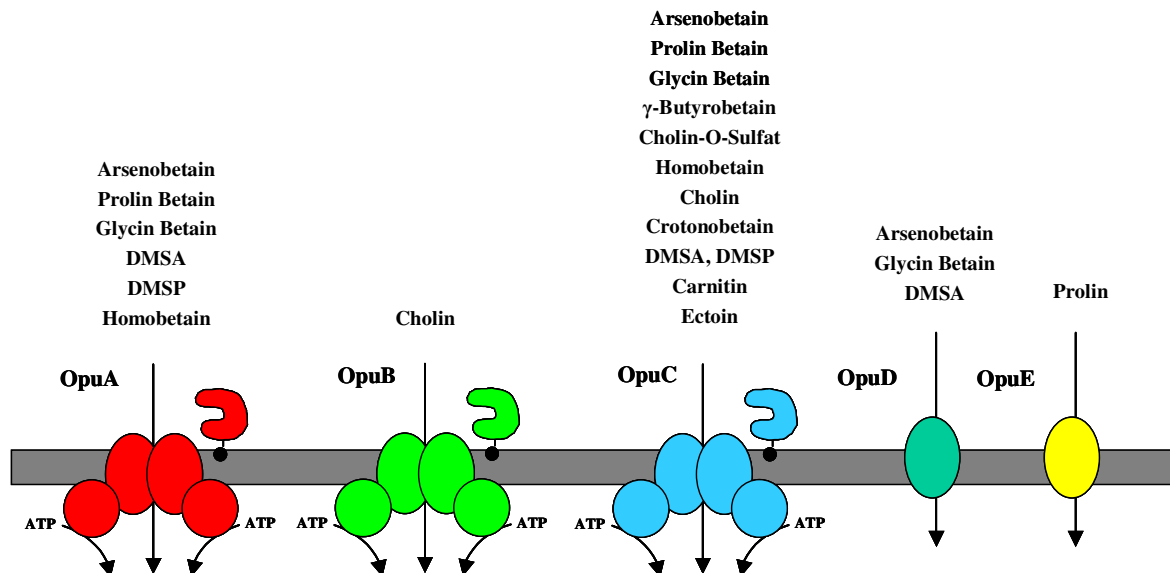


In *B. subtilis* wurden fünf Transportsysteme (OpuA – E) (Abb. 3) identifiziert, die die Aufnahme kompatibler Solute vermitteln. Diese überlagern sich in ihrer Substratspezifität und stellen somit sicher, dass *B. subtilis* dadurch eine Vielzahl organischer Osmolyte aus der Umwelt aufnehmen kann. Diese Transporter vermitteln sowohl die durch Salzstress induzierte Aufnahme von kompatiblen Soluten, als auch die durch Hitze- und Kältestress (Holtmann *et al.*, 2004).

Die Transporter OpuA, OpuB und OpuC gehören zu der Familie der ABC-Transporter (ATP Binding Cassette) (Kempf & Bremer, 1995; Davidson *et al.*, 2008). Durch die Hydrolyse von ATP wird die Energie für die Substrattranslokation geliefert. Die Strukturgene ihrer Komponenten sind in einem Operon organisiert und ihre Transkription ist osmotisch induziert. Der Transporter OpuA besteht aus drei Untereinheiten (Horn *et al.*, 2005): der ATPase (OpuAA) sowie der Permease (OpuAB), die zusammen den eigentlichen Translokationskomplex bilden, und dem Substratbindeprotein (OpuAC) (Kempf & Bremer, 1995). OpuA hat ein moderates Substratspektrum, wobei das System eine hohe Transportkapazität für Glycin Betain aufweist, was es zum dominanten GB-Transporter in *B. subtilis* macht (Kappes *et al.*, 1996). OpuB und OpuC besitzen jeweils eine andere zweite Transmembrandomäne (OpuBD und OpuCD). Das größte Spektrum an Substraten kann OpuC aufnehmen (Bremer & Krämer, 2000), OpuB hingegen vermittelt nur den Transport von Cholin, dem Vorläufer für die GbsAB-vermittelte Glycin Betain Synthese (Boch *et al.*, 1996). Die Substratbindeproteine aller drei ABC-Transporter sind über eine Modifikation von Lipidbestandteilen in der Cytoplasmamembran verankert (Kempf *et al.*, 1997; Kappes *et al.*, 1996). OpuD und OpuE sind Transporter, die jeweils aus einer Einzelkomponente bestehen. OpuD wird in die Familie der BCCT-Transporter (Betain Cholin Carnitin Transporter) eingeordnet (Kappes *et al.*, 1996). Diese Transporterfamilie ist bisher nur in Mikroorganismen gefunden worden (Saier *et al.*, 1999). Sie werden über einen Protonen- oder Natriumgradienten angetrieben und nehmen die Substrate im Symport mit den Protonen oder dem Natrium auf. Viele Mitglieder dieser Familie sind involviert in die Aufnahme osmotischer Schutzsubstanzen wie z.B. der Ectoin-Transporter EctT aus *V. pantothenicus* oder das Betain/Ectoin-Aufnahmesystem LcoP aus *Corynebacterium glutamicum* (Kuhlmann, unveröffentlicht; Steger *et al.*, 2004).

OpuE gehört zu der Superfamilie der SSS-Transporter (Sodium Solute Symporter) (Reizer *et al.*, 1994; Saier, 2000). Diese Transporter sind im Gegensatz zu BCCT-Transportern auch in eukaryotischen Zellen zu finden. Unter hyperosmolaren Bedingungen vermittelt OpuE, als einziges Aufnahmesystem in *B. subtilis* die Aufnahme von Prolin (von Blohn *et al.*, 1997).

Prolin wird im Symport mit  $\text{Na}^+$  in die Zelle transportiert. OpuE ist auch für den Rücktransport von Prolin, welches aufgrund der hohen cytoplasmatischen Konzentrationen während der *de novo* Synthese in das Medium diffundiert, verantwortlich (Moses, 1999).



**Abbildung 3: Transportsysteme zur Aufnahme kompatibler Solute in *B. subtilis* mit ihren Substratspezifitäten.** Dargestellt sind die Importsysteme OpuA, OpuB und OpuC, die zur Gruppe der bindprotein abhängigen ABC-Transporter gehören, sowie die sekundären Transporter OpuD und OpuE (Bremer, 2002).

## 6. Die Synthese von kompatiblen Soluten in *B. subtilis*

### 6.1 Die Rolle von Glutamat als Osmoprotektivum und die Akkumulation von Prolin durch *de novo* Synthese

Glutamat spielt in allen Domänen des Lebens eine sehr wichtige Rolle. Es ist als zentrales Metabolit für die Synthese von Aminosäuren von großer Bedeutung. Glutamat ist das häufigste Anion in der Zelle (100-200 mM) (Picossi *et al.*, 2007) und übernimmt mehrere Aufgaben. Zum einen ist es essentiell für die Proteinbiosynthese und zum anderen hat es mit seiner Rolle als Verbindungsglied zwischen dem Kohlenstoff – und Stickstoffkreislauf eine wesentliche Stellung im Stoffwechsel vieler Mikroorganismen, so auch im Modellorganismus *B. subtilis* (Wacker *et al.*, 2003). Beide Stoffwechselsysteme üben eine Rückkopplung auf die Glutamatsynthese aus (Belinski & Sonenshein, 2004). *B. subtilis* ist in der Lage mit Glutamat als einziger Stickstoffquelle zu wachsen. Darüber hinaus dient Glutamat zusammen mit der Aminosäure Glutamin als Donor für Amino- und Ammoniumgruppen für die Biosynthese von fast allen zellulären Stickstoffverbindungen (Fisher & Sonenshein, 1991).

Glutamat hat weiterhin eine wichtige Bedeutung in der Osmoprotektion in *B. subtilis*, denn es fungiert als Vorläufermolekül für die salzstress-induzierte Prolinsynthese. Es kann bei exogener Zugabe als Protektivum bei Salz- und Hitzestress dienen (Holtmann & Bremer, 2004). In Laborversuchen konnte gezeigt werden, dass *B. subtilis* unter hyperosmolaren Wachstumsbedingungen durch die Zugabe von Glutamat in das umgebende Medium einen nachweisbaren Wachstumsvorteil hat (Brill, 2002; Dolezal, 2006).

Zahlreiche unterschiedliche *Bacillus*-Arten und verwandte Genera sind überdies in der Lage unter hyperosmolaren Bedingungen Glutamat *de novo* zu synthetisieren und dieses als Osmoprotektivum zu nutzen (Kuhlmann & Bremer, 2002; Bursy *et al.*, 2007). Allerdings zählt Glutamat trotz seiner schützenden Wirkung bei Salzstress zu den schwachen Osmoprotektiva. Andere *Bacillus*-Arten, wie z.B. *Bacillus cereus*, akkumulieren Glutamat als einzige Schutzsubstanz gegen Salzstress. Diese sind allerdings nicht fähig hohe Salinitäten zu ertragen (Kuhlmann, 2002). Bei moderat hypertonen Bedingungen hingegen stellt Glutamat das dominante *de novo* synthetisierte Solut in *B. subtilis* dar. Die endogene Glutamatsynthese erfolgt über die Glutamatsynthase (GOGAT = 2-Oxoglutarat-Glutamin-Aminotransferase), welche aus den beiden Untereinheiten GltA und GltB besteht (Belitski & Sonenshein, 2004), und die Reaktion von Glutamin und 2-Oxoglutarat zu zwei Molekülen Glutamat katalysiert. Die Gene *gltA* und *gltB*, die für die Glutamatsynthase codieren, sind in einem Operon organisiert. Dieses Operon unterliegt zum einen der Kontrolle durch GltC und zum anderen kann es durch das Repressorprotein TnrA reprimiert werden. Die Repression von *gltAB* durch TnrA wird durch das Endprodukt Glutamat ausgelöst (Belitsky, 2002).

Steigt nun die externe Osmolarität auf hyperosmotische Bedingungen an, so wird Glutamat, als schwaches Osmoprotektivum durch Prolin ersetzt. Die Prolinsynthese als osmotische Adaptation zählt zur zweiten Phase der Reaktion auf eine hyperosmolare Umwelt. Prolin wird als kompatibles Solut im Cytoplasma akkumuliert. Die *de novo* Synthese von Prolin als osmotische Schutzsubstanz ist in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien (Kawahara *et al.*, 1989; Guillouet & Engasser, 1995) zu finden, aber auch in Pflanzen (Delauney & Verma, 1990). Prolin spielt ebenso wie Glutamat eine wichtige Rolle und gehört zu den bedeutendsten osmotischen Schutzsubstanzen in *B. subtilis*. Es wird als proteinogene Aminosäure im Anabolismus benötigt und kann von *B. subtilis* als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zum Wachsen genutzt werden (Kempf & Bremer, 1998; Moses, 1999). In *B. subtilis* existieren zwei Prolinsynthesewege. Erstens der ProBA-Weg, welcher für die anabole Prolinsynthese zuständig ist und die Enzyme ProB, ProA, ProI und ProG umfasst (Buxton, 1980; Belitsky *et al.*, 2001), und zweitens der ProHJ-Weg. Die Synthesegene *proH* und *proJ*

für Prolin liegen in einem Operon und werden durch Salz induziert. Das Ausgangsprodukt für die Prolinsynthese ist Glutamat. Dieses wird durch die Enzyme ProH und ProJ zu Prolin umgesetzt (Brill, 2002; Dolezal, 2006). Die  $\gamma$ -Glutamylphosphatreduktase (ProA) wird in beiden Synthesewegen verwendet und unterliegt keiner osmotischen Regulation. Ihr Basislevel reicht aus, um die Prolinsynthese unter Salzstress zu gewährleisten (Brill, 2002). Steigt die Salzkonzentration im Medium plötzlich von 0 M auf 0,4 M NaCl, so erhöht sich die interne Prolinkonzentration massiv und steigt innerhalb von 7 Stunden von einem Basallevel von 16 mM auf ca. 700 mM (Whatmore *et al.*, 1990). Es besteht dabei ein proportionaler Zusammenhang zwischen der Osmolarität des Mediums und der akkumulierten Prolinmenge (Brill, 2002). Dass die Prolinsynthese für die Osmostressantwort von großer Bedeutung ist, zeigt eine Mutante, in der die Gene *proH* und *proJ* ausgeschaltet sind. Diese hat eindeutige Wachstumsnachteile unter hyperosmolaren Bedingungen (Brill, 2002; Dolezal, 2006). Allerdings gilt für die energetisch ungünstigere *de novo* Synthese von Prolin, falls extern nutzbare Solute vorhanden sind, wird der Transport der Produktion vorgezogen.

## 6.2 Die Synthese von Glycin Betain

Glycin Betain ist eines der potentesten und das meistgenutzte Osmoprotektivum in Bakterien, Pflanzen, Tieren und auch menschlichen Zellen (Burg & Ferraris, 2008; Burg *et al.*, 1997; Csonka & Epstein, 1996; Kempf & Bremer, 1998; McNeil *et al.*, 1999; Rhodes & Hanson, 1993). In Mikroorganismen existieren für die Synthese des trimethylierten Aminosäurederivates zwei verschiedene Wege. Einige Bakterien, darunter halophile und halotolerante phototrophe Cyanobakterien (Reed *et al.*, 1986; Sibley & Yopp, 1987) und halophile *Archaea* (Lai *et al.*, 1999), sowie viele höhere Pflanzen können Glycin Betain bei Osmostress *de novo* synthetisieren. Dabei wird die Aminosäure Glycin in einer dreistufigen Methylierungsreaktion zu Glycin Betain umgewandelt. Als Zwischenprodukte erhält man Sarcosin und Dimethylglycin. S-Adenosyl-Methionin fungiert dabei als Methyl-Gruppen-Donor (Galinski & Trüper, 1994). Es werden für die Regeneration einer aktiven Methylgruppe des S-Adenosyl-Methionins zwölf ATP Äquivalente verbraucht (Atkinson, 1977). Da der energetische Aufwand dieser Glycin Betain Synthese sehr hoch ist, ist diese *de novo* Synthese unter den heterotrophen Bakterien wenig verbreitet. Eine Ausnahme bildet der extrem halophile Actinomycet *Actinopolyspora halophila* (Nyyssola & Leisola, 2001; Nyyssola *et al.*, 2000).

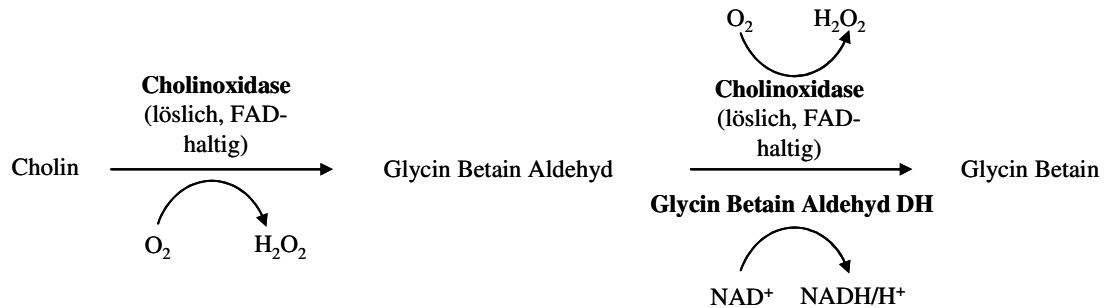
Der zweite Biosyntheseweg, die enzymatische Oxidation von Cholin zu Glycin Betain, ist der am häufigsten verwendete Weg in Prokaryoten und Eukaryoten. Allerdings können die dabei beteiligten Enzyme variieren (Bremer & Krämer, 2000).

In den Gram-positiven Bakterien *Arthrobacter pascens* und *A. globiformis* (Rozwadowski *et al.*, 1991) und in dem Schleimpilz *Cylindrocarpon didymum* konnte eine FAD-haltige lösliche Cholinoxidase identifiziert werden, welche in der Lage ist beide Schritte der Cholinoxidation zu Glycin Betain über das Zwischenprodukt Glycin Betain Aldehyd auszuführen. Als Elektronenakzeptor dieser Reaktion dient Sauerstoff, der zu Wasserstoffperoxid reduziert wird (Ikuta *et al.*, 1977; Otha *et al.*, 1983; Rozwadowski *et al.*, 1991; Quaye *et al.*, 2008). Zusätzlich besitzen diese Organismen aber noch eine Glycin Betain Aldehyd Dehydrogenase, die die zweite Reaktion, die Oxidation von Glycin Betain Aldehyd zu Glycin Betain, katalysieren kann (Abb.4). Die bekannten Glycin Betain Aldehyd Dehydrogenasen weisen eine deutlich höhere Affinität zu ihrem Substrat Glycin Betain Aldehyd auf, als die Cholinoxidasen aus *A. pascens* und *A. globiformis* (Ikuta *et al.*, 1977; Rozwadowski *et al.*, 1991). Das Vorhandensein einer zusätzlichen Glycin Betain Aldehyd Dehydrogenase kann mehrere Gründe haben: (i) Die Zelle ist aufgrund der hohen Toxizität des reaktiven Glycin Betain Aldehyds bestrebt, dieses Zwischenprodukt nicht anzuhäufen. (ii) Durch die rasche Umsetzung des energiereichen Zwischenproduktes und die damit verbundene Entfernung des Reaktionsproduktes aus dem Gleichgewicht wird das Gleichgewicht der energetisch ungünstigeren Oxidationsreaktion von Cholin zu Glycin Betain Aldehyd positiv beeinflusst. (iii) Die Glycin Betain Aldehyd Dehydrogenasen verwenden  $\text{NAD}^+$  als Cofaktoren (Landfald & Strøm, 1986). Bei der Oxidation von Glycin Betain Aldehyd zu Glycin Betain entsteht somit  $\text{NADH}$ , welches zur ATP-Synthese genutzt werden kann. Dieser Energiegewinnungsschritt findet bei der Verwendung der Cholinoxidase nicht statt, da hier die Elektronen direkt auf den Sauerstoff übertragen werden (Rozwadowski *et al.*, 1991).

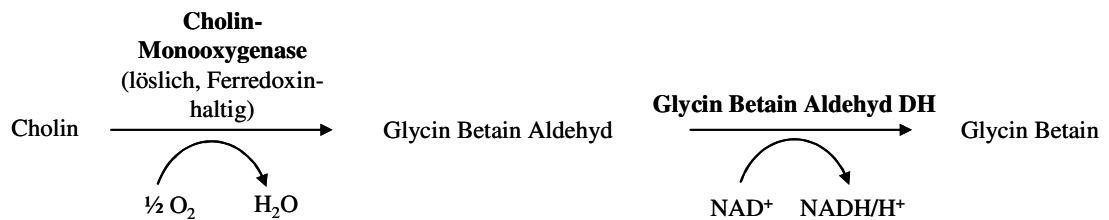
Höhere Pflanzen und Gram-negative Bakterien besitzen eine konservierte Glycin Betain Aldehyd Dehydrogenase, welche die Umsetzung von Glycin Betain Aldehyd zu Glycin Betain katalysiert. Die Oxidation von Cholin zu Glycin Betain Aldehyd wird in Pflanzen von Cholin Monooxygenasen und in Bakterien von Cholin Dehydrogenasen katalysiert (Pocard *et al.*, 1997; Rathinasabapathi *et al.*, 1997). Pflanzen besitzen eine lösliche Cholin Monooxygenase und eine lösliche Glycin Betain Aldehyd Dehydrogenase (Abb.4) (Rathinasabapathi *et al.*, 1997; Russel *et al.*, 1998). Bei der Cholin Monooxygenase aus Spinat (*S. oleracea*) handelt es sich um ein Ferredoxin-abhängiges Enzym, das neben Eisen-Schwefel-Clustern auch noch mononukleare Fe-Zentren besitzt. Die Cholin Monooxygenase

ist ausschließlich im Stroma der Chloroplasten und damit direkt am Ort der Photosynthese und der Ferredoxinbindung lokalisiert (Russel *et al.*, 1998).

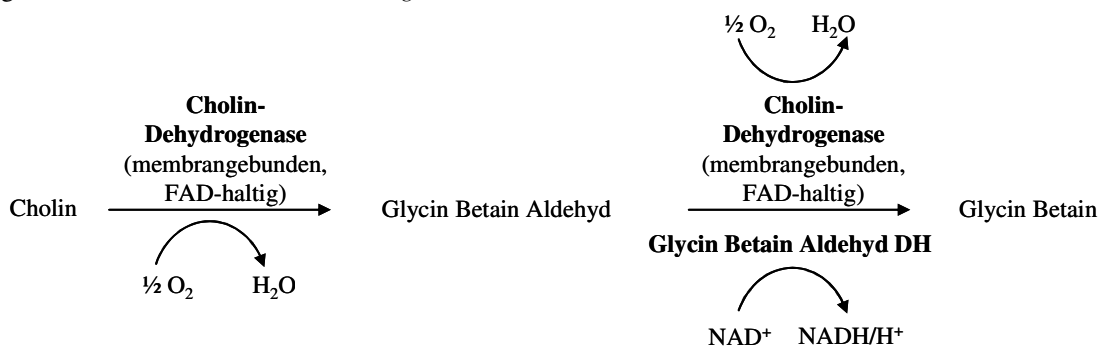
*A. pascens*, *A. globiformis*



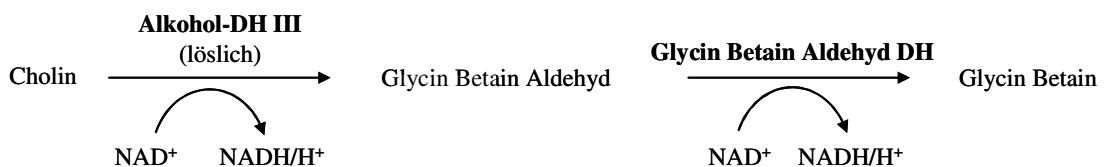
Pflanzen, z.B. *S. oleracea*



Gram-negative Bakterien, z.B. *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. meliloti*



*B. subtilis*



**Abbildung 4: Unterschiedliche Glycin Betain Synthesewege.** Gezeigt sind die Glycin Betain Synthesewege aus *A. globiformis*, *A. pacens*, Pflanzen (*S. oleracea*), den Gram-negativen Bakterien *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. meliloti* und dem Gram-positiven Bakterium *B. subtilis*.

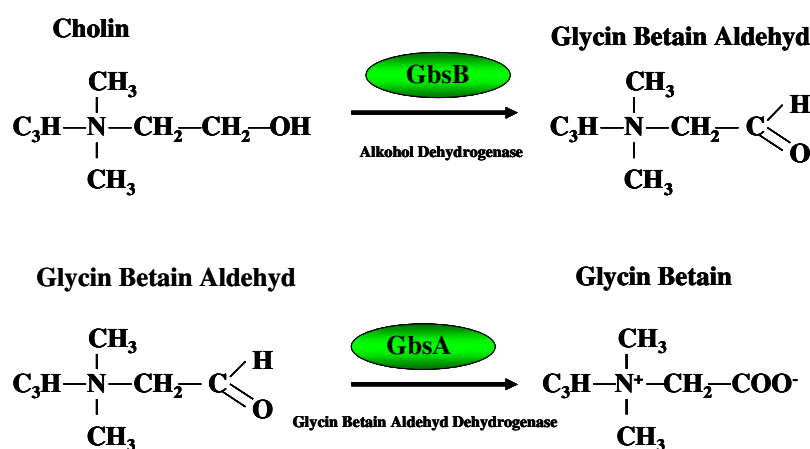
Der osmoregulierte Weg von Cholin zu Glycin Betain ist auf molekularer Ebene für den Gram-negativen Modellorganismus *E. coli* (Lamark *et al.*, 1996) und den Gram-positiven Modellorganismus *B. subtilis* (Boch *et al.*, 1996; Kappes *et al.*, 1999) charakterisiert. Diese beiden Bakterien können den Vorläufer Cholin nicht selbst synthetisieren, sie beziehen Cholin aus ihrer Umgebung, wo es durch verrottetes Tier- und Pflanzenmaterial zur Verfügung steht.

In *E. coli* erfolgt die hochaffine Aufnahme von Cholin in die Zelle durch das BetT-System ( $K_m = 8 \mu\text{M}$ ). Der BetT-Transporter, ein Mitglied der BCCT-Familie, ist ein Einkomponentensystem, bestehend aus 12 Transmembrandomänen, bei dem sich sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus im Cytoplasma befindet (Tøndervik & Strøm, 2007). Die Energetisierung des Transports erfolgt durch einen Protonengradienten (Styrvold *et al.*, 1986; Lamark *et al.*, 1991). Neben BetT kann auch das ProU-System Cholin transportieren. Dies erfolgt jedoch mit einer geringeren Affinität ( $K_m = 1,5 \text{ mM}$ ) (Lamark *et al.*, 1992). An der Umsetzung von Cholin sind in *E. coli* die beiden Enzyme BetA und BetB beteiligt. BetA ist eine FAD-abhängige, membrangebundene Cholin Dehydrogenase (BetA), die sowohl Cholin zu Glycin Betain Aldehyd, als auch Glycin Betain Aldehyd zu Glycin Betain konvertieren kann (Abb.5) (Bremer & Krämer, 2000). Die Umsetzung von Cholin mittels BetA ist sauerstoffabhängig und bei dieser Reaktion entsteht kein  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Landfald & Strøm, 1986; Eshoo, 1988; Lamark *et al.*, 1991; Boyd *et al.*, 1991). Das BetB-Enzym kann nur den zweiten Teil des Syntheseweges, die Umsetzung des toxischen Glycin Betain Aldehyds, katalysieren. BetB benötigt für die Katalyse  $\text{NAD}^+$  als Elektronenakzeptor und ist sehr salztolerant (Falkenberg & Strøm, 1990).

Die Glycin Betain Synthese hängt von der Verfügbarkeit von Cholin ab. Die Anwesenheit dieses Vorläufers in der Umwelt ist für *E. coli* bedeutsam für die Expression der Gene sowohl für die Aufnahme als auch für die enzymatische Oxidation. Die Gene für BetA und BetB liegen zusammen mit dem Gen für das Regulatorprotein BetI in einem Operon vor. Vor diesem Operon liegt in entgegengesetzter Richtung das Gen für den Cholintransporter BetT. Die Expression des *betIAB*-Operons wird durch Erhöhung der Osmolarität im Medium stimuliert (Bremer & Krämer, 2000). Zur maximalen Expression ist aber der Effektor Cholin nötig. In *E. coli* fungiert BetI, ein Mitglied der TetR-Familie von bakteriellen Regulatoren, als spezifischer, cholinsensitiver Repressor. Dieser koordiniert die Transkription des entgegengesetzt orientierten *betIBA*-Operons und des *betT*-Gens (Røkenes *et al.*, 1996). Die Oxidation von Cholin durch die Cholin Dehydrogenase BetA kann nur in der Anwesenheit von Sauerstoff beobachtet werden. Unter anaeroben Bedingungen reprimiert das DNA-bindende Protein ArcA sowohl den Promotor von *betT*, als auch von *betIBA* (Lamark *et al.*,

1996). Die *bet*- Gene unterliegen somit der Kontrolle des Zwei-Komponenten-Systems ArcAB (Aerobic respiration control). Dieses besteht aus der membrangebundenen Histidinkinase ArcB und dem cytoplasmatischen Response Regulator ArcA. Die Anwesenheit von exogenem Glycin Betain führt zu einer Repression des *betIAB*-Opreons und damit wird die energetisch ungünstige Synthese von Glycin Betain aus Cholin eingestellt (Eshoo, 1988).

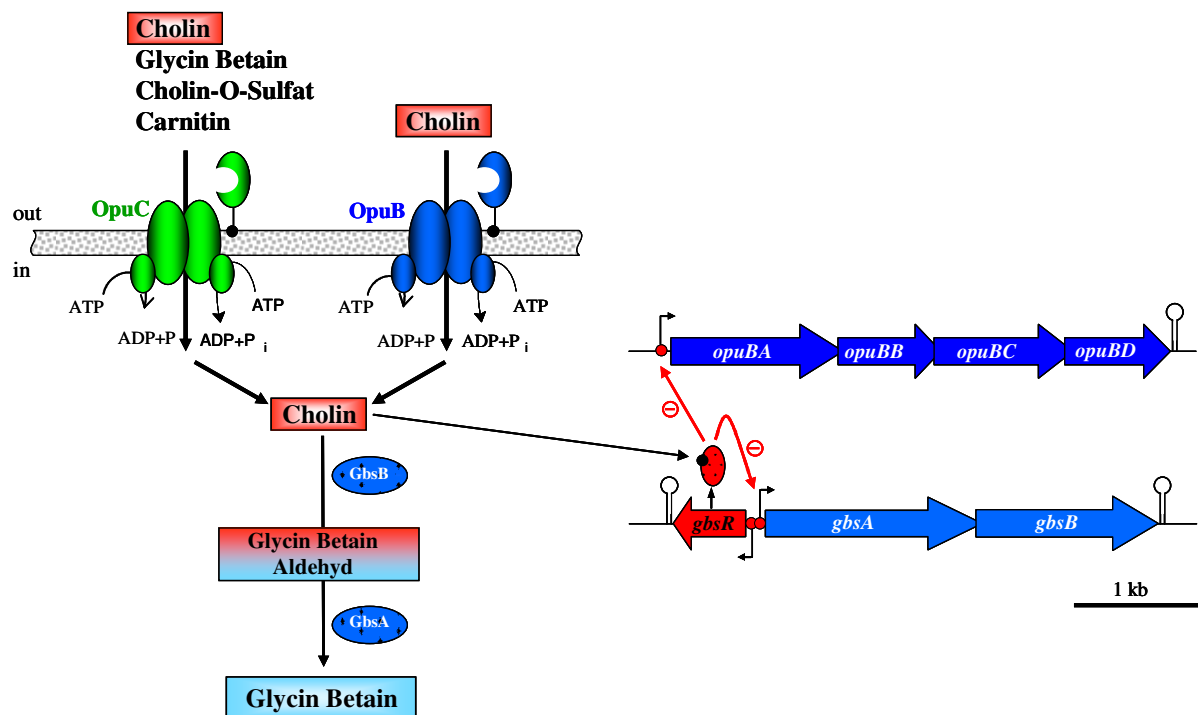
In *B. subtilis* wird die Cholinaufnahme von dem OpuB- und OpuC-System vermittelt. OpuB und OpuC sind ABC-Transporter, die evolutionär sehr nah verwandt sind. Wie schon erwähnt, kann OpuC das größte Spektrum an Substraten aufnehmen (Bremer & Krämer, 2000) und besitzt eine gute Affinität zu Cholin ( $K_m = 38 \mu\text{M}$ ). OpuB, auch ein Bindeprotein-abhängiges Transportsystem, hingegen ist für die hochaffine Aufnahme von Cholin ( $K_m = 1 \mu\text{M}$ ) aus dem Medium verantwortlich (Kappes *et al.*, 1999). Die Strukturgene von OpuB und OpuC sind nur ein paar Kilobasen auf dem *B. subtilis* Chromosom voneinander entfernt, und ihre Genprodukte besitzen eine hohe Sequenzidentität zueinander (83 % für OpuBA/OpuCA, 85 % für OpuBB/OpuCB, 69 % für OpuBC/OpuCC und 85 % für OpuBD/OpuCD). Diese Tatsachen legen nahe, dass die *opuB*- und *opuC*-Loci durch eine Genduplikation entstanden sind (Kappes *et al.*, 1999) und sich dann hinsichtlich ihrer Substratspezifität evolutiv weiterentwickelt haben (OpuC). Zur Oxidation von Cholin zur osmotischen Schutzsubstanz Glycin Betain bedient sich *B. subtilis* der Enzyme GbsA und GbsB (Boch *et al.*, 1996). Bei GbsB handelt es sich um eine lösliche NAD-abhängige Alkohol Dehydrogenase vom Typ III. Diese oxidiert Cholin zu der Zwischenstufe Glycin Betain Aldehyd. Dieses toxische Zwischenprodukt wird anschließend durch eine salztolerante Glycin Betain Aldehyd Dehydrogenase (GbsA) (Boch *et al.*, 1997) zum Endprodukt Glycin Betain umgewandelt (Abb.5).



**Abbildung 5: Glycin Betain Synthese in *B. subtilis*.** Glycin Betain wird über einen zweistufigen Oxidationsprozess aus Cholin gebildet (Kempf & Bremer, 1998).



Auch in *B. subtilis* hängt die Glycin Betain Synthese von der Verfügbarkeit von Cholin ab. Die Anwesenheit dieses Vorläufers in der Umwelt ist somit auch für *B. subtilis* bedeutsam für die Expression der Gene sowohl für die Aufnahme als auch für die enzymatische Oxidation. Die Gene für GbsA und GbsB sind in einem Operon organisiert. In *B. subtilis* existiert kein BetI- verwandtes Protein. Dafür findet man einen anderen Typ eines cholinsensitiven Regulators. Das Protein GbsR wird von einem Gen codiert, das entgegengesetzt von dem *gbsAB* Glycin Betain Syntheseweg Genclusters liegt (Boch, 1996). Das Ausschalten dieses Gens hat eine verstärkte Aufnahme von Cholin durch OpuB, aber nicht durch OpuC, zur Folge (Boch *et al.*, 1996). Auch tritt durch das Fehlen dieses Gens eine verstärkte Expression des *gbsAB*-Operons auf (Nau-Wagner, 1999). Die Transkription der *gbsAB*-Gene in *B. subtilis* ist im Gegensatz zu *E.coli* nicht osmotisch kontrolliert (Boch *et al.*, 1996), sie wird allein durch die Präsenz von Cholin stimuliert, *opuB* kann allerdings noch zusätzlich osmotisch induziert werden (siehe Arbeitsmodell Abb. 6) (Kappes *et al.*, 1999).



**Abbildung 6: Aufnahme von Cholin und Synthese von Glycin Betain in *B. subtilis*.**

Cholin wird über die beiden Transportsysteme OpuB und OpuC in die Zelle aufgenommen und dort in einer zweistufigen Oxidation mittels der Enzyme GbsA und GbsB zu Glycin Betain umgewandelt. GbsR codiert für ein Repressorprotein, welches die Aktivität des *gbsAB*-Operons und des *opuB*-Operons kontrolliert.

## 7. Zielsetzung der Arbeit

*B. subtilis* synthetisiert, wenn der Vorläufer Cholin in der Umgebung zur Verfügung steht, große Mengen des kompatiblen Solutes Glycin Betain *de novo* als Antwort auf hyperosmolare Wachstumsbedingungen. Es wurde bereits gezeigt, dass die Glycin Betain Synthese über eine zweistufige Oxidationsreaktion erfolgt (Boch *et al.*, 1996).

Die Oxidation von Cholin zu Glycin Betain erfolgt mit Hilfe der beiden Enzyme GbsB und GbsA. GbsB ist eine Alkoholdehydrogenase und vermittelt die Reaktion von Cholin zu Glycin Betain Aldehyd. Bei GbsA handelt es sich um eine Glycin Betain Aldehyd Dehydrogenase, die die Reaktion des Aldehyds zu Glycin Betain katalysiert (Boch *et al.*, 1997; Nau-Wagner, 1999). In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Cholin als Induktor für die Expression fungiert (Nau-Wagner, 1999). Weiterhin ist bekannt, dass das Ausschalten des *gbsR*-Gens, welches sich in entgegengesetzter Orientierung zu dem *gbsAB*-Operon befindet und für den Regulator GbsR codiert, eine verstärkte Expression des *gbsAB*-Operons verursacht (Nau-Wagner, 1999). Offen bleibt die Frage, wie der Regulationsmechanismus zur Abschaltung der Glycin Betain Synthese erfolgt. Ein Ziel dieser Arbeit war demnach den Regulationsmechanismus zur Abschaltung der Glycin Betain Synthese zu identifizieren.

Weiterhin sollte in der vorliegenden Arbeit das GbsR-Protein überexprimiert und gereinigt werden. Anschließend war es ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit das GbsR-Protein hinsichtlich seiner DNA-Bindung und Cholinbindung zu analysieren.

Auch der Einfluss von GbsR auf die beiden ABC-Transporter OpuB und OpuC, welche die Aufnahme von Cholin in die Zelle vermitteln (Kappes *et al.*, 1999), sollte in dieser Arbeit genauer untersucht werden.

## III. Material und Methoden

### 1. Chemikalien und Reagenzien

Soweit nicht anders angegeben stammten die verwendeten Chemikalien von den Firmen Acros Organics (Geel, B), AppliChem (Darmstadt, D), Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe, D), Fluka Chemie AG (Buchs, CH), Merck KGaA (Darmstadt, D) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D). Bestandteile der Vollmedien wurden von der Firma Becton Dickinson (Sparks, USA) bezogen.

#### 1.1 Verwendete kompatible Solute und Aminosäuren

Die Aminosäure Phenylalanin und Tryptophan, sowie das kompatiblen Solut Glycin Betain, sowie dessen Vorstufen Glycin Betain Aldehyd und Cholin wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D) bezogen.

### 2. Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Die Bezeichnung der Gene entspricht der von Bachmann (1990) vorgeschlagenen Nomenklatur.

#### 2.1 Bakterienstämme

##### 2.1.1 *Escherichia coli*-Stämme

In Tabelle 1 sind die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme aufgeführt.

**Tabelle 1:** *Escherichia coli*-Stämme

Stamm	Beschreibung	Referenz/Quelle
<b>DH5α</b>	F <sup>-</sup> λ <sup>-</sup> E44 Δ( <i>argF-lac</i> )U169φ80 <i>dlacΔ(lacZ)</i> M15 <i>hsdR17 recA1 endA1 gyr96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983
<b>BL21</b>	F <sup>-</sup> <i>gal met r<sup>-</sup> hsdS</i> (λDE3)	Stratagene, Heidelberg

### 2.1.2 *Bacillus subtilis*-Stämme

In Tabelle 2 sind die in dieser Arbeit verwendeten *Bacillus subtilis*-Stämme aufgeführt.

**Tabelle 2:** *Bacillus subtilis*-Stämme

Stamm	Beschreibung	Referenz/Quelle
JH642	<i>trpC2 pheA1</i>	BGSC <sup>a</sup> , 1A96
FSB1	JH642 $\Delta(treA::neo)$	Spiegelhalter & Bremer, 1998
JBB8	JH642 $\Delta(gbsR::neo)$	Boch, 1996
GNB37	JH642 $\Delta(treA::erm)$	Nau-Wagner, 1999
GNB40	$(gbsR::neo)1 \Delta(treA::erm)2$	Nau-Wagner, 1999
GNB45	GNB37 [ <i>amyE::Φ(gbsA`-treA, Δ(gbsR)2)I</i> ], Cml <sup>r</sup> , Erm <sup>r</sup>	Nau-Wagner, 1999
GNB48	GNB40 [ <i>amyE::Φ(gbsA`-treA, Δ(gbsR)2)I</i> ], Cml <sup>r</sup> , Erm <sup>r</sup>	Nau-Wagner, 1999
GNB52	GNB37 [ <i>amyE::Φ(gbsA`-treA, Δ(gbsR)2)3</i> ], Cml <sup>r</sup> , Erm <sup>r</sup>	Nau-Wagner, 1999
GNB53	GNB37 [ <i>amyE::Φ(gbsA`-treA, Δ(gbsR)2)4</i> ], Cml <sup>r</sup> , Erm <sup>r</sup>	Nau-Wagner, 1999
GNB54	GNB37 [ <i>amyE::Φ(gbsA`-treA, Δ(gbsR)2)5</i> ], Cml <sup>r</sup> , Erm <sup>r</sup>	Nau-Wagner, 1999
GNB63	GNB52 ( <i>gbsR::neo</i> )	Nau-Wagner, 1999
GNB64	GNB53 ( <i>gbsR::neo</i> )	Nau-Wagner, 1999
GNB65	GNB54 ( <i>gbsR::neo</i> )	Nau-Wagner, 1999
GNB66	GNB37 [ <i>amyE::Φ(opuB-treA)I</i> ], Cml <sup>r</sup> , Erm <sup>r</sup>	Nau-Wagner, 1999
GNB67	$\Delta(treA::erm2) amyE::Φ(opuC-treA)1$	Nau-Wagner, 1999
GNB68	GNB66 ( <i>gbsR::neo</i> )1	Nau-Wagner, 1999
GNB69	$(gbsR::neo)1 \Delta(treA::erm)2 amyE::Φ(opuC-treA)1$	Nau-Wagner, 1999
GNB70	$(gbsR::neo)1 (yuaV::spc)2 \Delta(treA::erm)2$ <i>amyE::Φ(opuB-treA)1</i>	Nau-Wagner
GNB73	$(yuaV::spc)2 \Delta(treA::erm)2 amyE::Φ(opuB-treA)1$	Nau-Wagner

GNB77	$\Delta(gbsAB::neo)2 \Delta(treA::erm)2 amyE::\Phi(opuB-$ $treA, yuaV+)2$	Nau-Wagner
GNB78	$(gbsR::neo)1 \Delta gbsA)1 \Delta(treA::erm)2$ $amyE::\Phi(opuB-treA, yuaV+)2$	Nau-Wagner
DHB2	JH642 $\Delta (treA::erm)2 amyE::\Phi(gbsR-treA)1,$ $Cml^r, Erm^r$	diese Arbeit
DHB3	JBB8 $\Delta (treA::erm)2 amyE::\Phi(gbsR-treA)1,$ $Cml^r, Erm^r$	diese Arbeit
DHB4	JH642 $\Delta (treA::erm)2 amyE::\Phi(gbsA^-treA)1,$ $Cml^r, Erm^r$	diese Arbeit
DHB5	JH642 $\Delta (treA::erm)2 amyE::\Phi(gbsA^-treA)2,$ $Cml^r, Erm^r$	diese Arbeit
DHB6	JH642 (pDH4), $Cml^r$	diese Arbeit
DHB8	JH642 (pDH5), $Cml^r$	diese Arbeit
DHB12	DHB3 $(gbsR::neo)1, Cml^r, Erm^r$	diese Arbeit
DHB13	DHB4 $(gbsR::neo)1, Cml^r, Erm^r$	diese Arbeit

## 2.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Plasmide sind in Tabelle 3 aufgelistet und beschrieben.

**Tabelle 3:** Plasmide

Stamm	Beschreibung	Referenz
pASK-IBA7	Expressionsvektor mit <i>Strep-tagII</i> <sup>®</sup> und Faktor Xa, $Amp^r$	IBA, Göttingen
pJMB1	Derivat von pMD476, Vektor geringer Kopienzahl (pACYC177 Replikationsursprung) mit promotorlosem $treA, Amp^r Cml^r, amyE$ front und back	M. Jebbar, unveröffentlicht
pX	Vektor geringer Kopienzahl, $Amp^r Cml^r, amyE$ front und back	W. Schumann
pDH1	pASK-IBA7plus $gbsR^+$	diese Arbeit

pDH2	Derivat von pJMB1; enthält ein 118 bp großes Fragment aus <i>gbsA</i> -Promotorregion fusioniert an promotorloses <i>treA</i>	diese Arbeit
pDH3	Derivat von pJMB1; enthält ein 142 bp großes Fragment aus <i>gbsA</i> - Promotorregion fusioniert an promotorloses <i>treA</i>	diese Arbeit
pDH4	Derivat von pX; enthält ein 1467 bp großes Fragment aus der <i>gbsR</i> - <i>gbsA</i> -Region	diese Arbeit
pDH5	Derivat von pX; enthält ein 1467 bp großes Fragment aus der <i>yuaV</i> - <i>opuBA</i> -Region	diese Arbeit
pGNB10	Derivat von pJMB1; enthält Fragment aus <i>gbsR</i> - Promotorregion fusioniert an promotorloses <i>treA</i>	G.Nau-Wagner, unveröffentlicht

### 2.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von biomers.net (Ulm, D) oder MWG (Martinsried, D) bezogen. Die Tabelle 4 benennt und beschreibt die zur Klonierung verwendeten Primer.

**Tabelle 4:** Klonierungsprimer für die Überexpresion von GbsR

Oligonukleotid	Sequenz (5' - 3')	Lage, Bemerkung
GbsR <i>BsaI</i> fwd	ATGGTAGGTCTCAGCGCGATGAAA ATCCAGAATTTGCAGCTA	Klonierungsprimer für <i>gbsR</i> aus <i>B. subtilis</i> über <i>BsaI</i> -Schnittstelle in pASK-IBA7 plus
GbsR <i>BsaI</i> rev	ATGGTAGGTCTCATATCATGTTTCG ACCGGTATAAATTTAAAAAT	Klonierungsprimer für <i>gbsR</i> aus <i>B. subtilis</i> über <i>BsaI</i> -Schnittstelle in pASK-IBA7plus

**Tabelle 5:** Primer aus dem Bereich des *gbsAB*-Operons und *opuBA*-Operons aus *B. subtilis*

Oligonukleotid	Sequenz (5' - 3')	Lage, Bemerkung
treA4/SmaI	CCACCCGGGCGAAACATGAGG	Klonierungsprimer für <i>gbsR</i> - <i>gbsA</i> -Promotorregion aus <i>B. subtilis</i> über SmaI-Schnittstelle in pJMB1.
cut1-BamHI-as	CGGGGATCCCTTGACGTAAATAAA GTTTG	Klonierungsprimer für <i>gbsR</i> - <i>gbsA</i> -Promotorregion aus <i>B. subtilis</i> über BamHI-Schnittstelle in pJMB1.
cut1-SmaI-s	CCACCCGGGGAAAAATCAAAATGG GAC	Klonierungsprimer für <i>gbsR</i> - <i>gbsA</i> -Promotorregion aus <i>B. subtilis</i> über SmaI-Schnittstelle in pJMB1.
treA1a/BamHI	CGGGGATCCTTGACTCATATAAGC	Klonierungsprimer für <i>gbsR</i> - <i>gbsA</i> -Promotorregion aus <i>B. subtilis</i> über BamHI-Schnittstelle in pJMB1.
<i>gbsR</i> -PromA-sense1/SpeI	AAAAGTAGTGCTCCCATTAGGTGG AAAG	Klonierungsprimer für <i>gbsR</i> - <i>gbsA</i> -Promotorregion aus <i>B. subtilis</i> über SpeI-Schnittstelle in pX
<i>gbsR</i> -PromA-antisense1/SpeI	AAAAGTAGTCCGTTTCCGAGTTTTA GTCG	Klonierungsprimer für <i>gbsR</i> - <i>gbsA</i> -Promotorregion aus <i>B. subtilis</i> über SpeI-Schnittstelle in pX
YvaV- <i>opuBA</i> -sense/SpeI	AAAAGTAGTGAGTAAGCTCTTCATC CAAC	Klonierungsprimer für <i>yvaV</i> - <i>opuBA</i> -Promotorregion aus <i>B. subtilis</i> über SpeI-Schnittstelle in pX
YvaV- <i>opuBA</i> -antisense/SpeI	AAAAGTAGTCAGGCTGTGTGTTTCAT AATC	Klonierungsprimer für <i>yvaV</i> - <i>opuBA</i> -Promotorregion aus <i>B. subtilis</i> über SpeI-Schnittstelle in pX

PE-gbsR2	GGAGTCAATAACAAGATCAAGAGC	5'-Modifikation: DY-781 für Primer Extension
PE-gbsA2	TGCAATTTCTTCTTGATTAAATGGG	5'-Modifikation: DY-781 für Primer Extension
PE-opuBA1	TGTCAGCAAACATCGCAC	5'-Modifikation: DY-781 für Primer Extension

**Tabelle 6:** Primer für die Real-Time PCR

Oligonukleotid	Sequenz (5' - 3')	Lage, Bemerkung
RT-gbsA1 fwd	TGGCCGCAGGAAACACAAT	interner Bereich von <i>gbsA</i>
RT-gbsA1 rev	ACCTTTTGGAAACACCGGCTTC	interner Bereich von <i>gbsA</i>

**Tabelle 7:** Zur Sequenzierung verwendete Primer

Oligonukleotid	Sequenz (5' - 3')	Lage, Bemerkung
pX fwd	CCACGAACTAAGTTGGTG	Sequenzier-Primer für pX
pX rev	GGGTAAC TATTGCCGATGATAAGC	Sequenzier-Primer für pX
pJMB1rev2	AAAAAAGGTCTCAAGTGA CTAAAG TAAACATTG	Sequenzier-Primer für pJMB1, downstream des <i>treA</i> -Gens
TreAfwd2	AGCACATCCACCTGTAGCG	Sequenzier-Primer für pJMB1, upstream des <i>treA</i> -Gens
pAsk-IBA fwd	GTGAAATGAATAGTTCGAC	Sequenzier-Primer für pASK- IBA7
pAsk-IBA rev	CGCAGTAGCGGTAAACGGC	Sequenzier-Primer für pASK- IBA7



**Tabelle 8:** Primer für Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Oligonukleotid	Sequenz (5' - 3')	Lage, Bemerkung
BSgbsA-box1_s	GTTGTAAAAACATTAAATTTT	
BSgbsA-box1_as	GCCTCCTTGACGTAAATA	5'-Modifikation: Cy5
BSopuB-box1_s	ACAAATTGTAACTTTTTATTTT	
BSopuB-box1_as	GCTTCCCATTATAGAATAAA	5'-Modifikation: Cy5
BSopuC-box1_s	AACACATTGTAACTTTTTATT	
BSopuC-box1_as	AATCCTTATTATAGTTTGAAC	5'-Modifikation: Cy5
Cy5gbsR-A5_s	GAAAAATCAAAATGGGAC	5'-Modifikation: Cy5
Cy5gbsR-A6_as	CTTGACGTAAATAAAGTTTG	5'-Modifikation: Cy5
Cy5gbsR-A3_s	GTTTAAAAACAATATGT	5'-Modifikation: Cy5
gbsR-A2_s	GGTTGTAAAAACATTAA	
yitM fwd	AGCAAGAAAGTGTGGCACAGG	
yitM rev Cy5	TGGAGGCTGTTTGCCAACTTC	5'-Modifikation: Cy5

### 3. Medien und Zusätze

#### 3.1 Medien

Als Vollmedium wurde LB (Luria-Bertani Broth), dessen Zusammensetzung in Tabelle 9 angegeben ist, verwendet (Miller, 1992). Festmedien wurden mit 15 g/l Agar hergestellt. Als Minimalmedium für den Überproduktionsstamm *E. coli* BL21 diente Minimalmedium A (MMA) (Sambrook *et al.*, 1989), wie in Tabelle 10 beschrieben, mit 0,4 % (w/v) Casaminosäuren, 0,4 % (w/v) Glucose, 0,2 g/l  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$  und 1 mg/ml Thiamin. Als definiertes Minimalmedium für *B. subtilis* diente Spizizen's Minimalmedium (SMM) (Spizizen, 1985) mit zusätzlichen Spurenelementen (Haarwood & Archibald, 1990), deren Zusammensetzung in den Tabellen 11 und 12 angegeben ist. Als C-Quelle wurde 0,5 % Glucose zugefügt. Zur Komplementation zweier Auxotrophien des *B. subtilis*-Stammes JH642 (*trpC2 pheA1*) und seiner Derivate wurde dem Medium Tryptophan (18 mg/l) und Phenylalanin (20 mg/l) zugesetzt.

**Tabelle 9:** Vollmedium LB

Substanz	Menge/Liter
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1 l

**Tabelle 10:** Minimalmedium A

Substanz	Menge/Liter
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g
Na <sub>3</sub> Citrat x 2 H <sub>2</sub> O	0,5 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1 l

**Tabelle 11:** Spizizen's Minimalmedium (SMM)

Substanz	Menge/Liter
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6 g
Na <sub>3</sub> Citrat x 2 H <sub>2</sub> O	1 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1 l

**Tabelle 12:** Spurenelementlösung 100 x

Substanz	Menge/Liter
CaCl <sub>2</sub>	0,55 g
FeCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1,35 g
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,10 g
ZnCl <sub>2</sub>	0,17 g
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,05 g
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,06 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,06 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1 l

### 3.2 Medienzusätze und Antibiotika

Medienzusätze und Antibiotika wurden als Stammlösungen in destilliertem Wasser bzw. Ethanol (Chloramphenicol, Tetracyclin) angesetzt, sterilfiltriert und in den in Tab. 13 angegebenen Endkonzentrationen je nach Bedarf zu den Medien gegeben.

**Tabelle 13:** Zusätze und Antibiotika

Substanz	Konzentration in Stammlösung	Endkonzentration	
		<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
Ampicillin	100 mg/ml	-	100 µg/ml
Chloramphenicol	30 mg/ml (EtOH)	5 µg/ml	30 µg/ml
Erythromycin	4 mg/ml	0,4 µg/ml	150 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	5 µg/ml	50 µg/ml
Spectinomycin	50 mg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml
Tetracyclin	5 mg/ml (EtOH)	15 µg/ml	5 µg/ml
Glycin Betain Aldehyd	100 mM	1 mM	-
Glycin Betain	100 mM	1 mM	-
Cholin	100 mM	1 mM	-
Anhydrotetracyclin	2 mg/ml	-	0,2 µg/ml
IPTG	0,5 M	-	0,5 mM

## 4. Mikrobiologische Methoden

### 4.1 Sterilisation

Medien und Lösungen wurden 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Hitzeempfindliche Substanzen wurden sterilfiltriert (Sterilfilter mit 0,2 µm Porengröße, Roth). Die Sterilisation von Glaswaren erfolgte 3 h bei 180°C.

### 4.2 Wachstumsbedingungen und Vermehrung von Bakterien

Alle Kulturen wurden aerob bei 37°C inkubiert. Die Inkubation erfolgte abhängig vom Volumen im Reagenzglas auf einem Roller (bis 10 ml) oder in Erlenmeyerkolben schüttelnd bei 220 rpm (größere Volumina). Überproduktionen (6 l) von GbsR erfolgten in 6 x 2 l Erlenmeyerkolben, in denen die Kultur zur Durchlüftung mit ca. 180 rpm geschüttelt wurde oder ggf. im 3,5 l Fermenter (Infors HT Minifors; Infors AG, Bottingen, CH), in dem die Sauerstoffsättigung, sowie pH-Wert und Rührgeschwindigkeit genauestens kontrolliert und aufeinander abgestimmt werden konnten.

Wachstumsexperimente mit *B. subtilis* bei hohen Osmolalitäten wurden folgendermaßen durchgeführt: 5 ml 1 x SMM wurden mit Kolonien von einer Agarplatte beimpft und über Tag bei 37 °C auf einem Roller inkubiert. Mit dieser Kultur wurde eine Übernachtskultur in 1 x SMM (20 ml) in 100 ml Erlenmeyerkolben angeimpft, mit der am nächsten Morgen die Hauptkultur beimpft wurde.

Sämtliche Kulturen wurden auf eine OD<sub>578</sub> von 0,1 beimpft. Zum Beimpfen wurden ausschließlich Vorkulturen verwendet, die eine OD<sub>578</sub> von maximal 2,0 besaßen. Hierbei wurde die Osmolalität des vorgelegten SMM mit NaCl so erhöht, dass nach dem Inokulieren mit der Übernachtskultur die gewünschte Endosmolalität erreicht wurde.

Festmedien wurden zunächst 1-2 Minuten bei 42°C im Wärmeschränk vorgewärmt und anschließend mit einer sterilen Glaspipette oder einer ausgeglühten Impföse beimpft. Die beimpften Platten wurden bei 37°C im Brutschränk inkubiert.

### 4.3 Ermittlung der Zelldichte

Die Ermittlung der Zelldichte einer Bakteriensuspensionen erfolgte photometrisch (Ultrospec 2100 *pro*, Amersham Biosciences, Freiburg, D) bei einer Wellenlänge von 578 nm. Es wird angenommen, dass eine OD<sub>578</sub> von 1 einer Zelldichte von  $1 \cdot 10^9$  Zellen/ml Kultur entspricht (Miller, 1992).

## 5. Molekularbiologische und genetische Methoden

### 5.1 Präparation von DNA

#### 5.1.1 Präparation von Plasmid DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde die Methode der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979) angewandt. Plasmid-DNA, die zur Klonierung eingesetzt werden sollte, wurde über QIAGEN-Säulen (tip-100) präpariert (QIAGEN Plasmid Midi Kit). Die Herstellerangaben wurden folgendermaßen modifiziert: Es wurden Zellen aus 100 ml Übernachtskultur (LB) abzentrifugiert, das Pellet in 10 ml P1 resuspendiert, 10 ml P2 und P3 zugegeben und 20 min. auf Eis inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden, wie im Handbuch von QIAGEN (Hilden, D) beschrieben, durchgeführt.

Zur DNA-Sequenzierung benötigte Plasmid-DNA wurde über eine QIAGEN-Säule (tip-20) aus 5 ml Kultur gewonnen (Mini Präparation) oder mit Hilfe des Gene JET Minipräp Kits von Fermentas Life Sciences (St. Leon-Roth, D).

#### 5.1.2 Präparation chromosomaler DNA aus *B. subtilis*

Chromosomale DNA aus *B. subtilis* wurde aus 10 ml Kultur (LB) nach einem nach Marmur modifizierten Protokoll (Marmur, 1961) isoliert. Das Protokoll ist nachfolgend aufgeführt:

- 10 ml einer Kultur der OD<sub>578</sub> = 1 pelletieren
- in 4 ml S-EDTA (150 mM NaCl, 100 mM EDTA; pH 8) homogen resuspendieren
- eine kl. Spatelspitze Lysozym zugeben
- 30 min bei 37°C inkubieren

- 0,3 ml SDS (25%ig) zugeben
- 60 min bei 60°C im Wasserbad inkubieren
- 1 ml 5M Na-Perchlorat (Endkonzentration 1M) zugeben
- 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) zugeben
- 30 min auf eine Schüttler (200 rpm) inkubieren
- Deproteinisierung: Zentrifugation 10 min bei 4.000 rpm
- 3 Phasen: obere wässrige Phase vorsichtig abnehmen
- in neues Gefäß mit 2 Vol. 95% EtOH (eiskalt) überführen und mischen
- DNA ausfällen, zentrifugieren und in 70% EthOH (eiskalt) waschen
- Pellet kurz trocknen (Alkohol abdampfen lassen) und in 0,1 bis 0,5 ml sterilem Wasser (je nach DNA-Menge) aufnehmen

### 5.1.3 Präparation von Gesamt-RNA aus *B. subtilis*

Die Zellernte von *B. subtilis* Kulturen zur Präparation von Gesamt-RNA wurde wie folgt durchgeführt: *B. subtilis* Kulturen wurden in 1 x SMM bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,25 inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe der jeweiligen Substanzen (0,4 M NaCl und / oder 1 mM Cholin). Nach 90 min wurden jeweils 20 ml dieser Kulturen mit 20 ml kaltem „Killingpuffer“ (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM NaN<sub>3</sub>; mit DEPC-Wasser auf 1 l aufgefüllt) gemischt und für 10 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde das erhaltene Zellpellet wurde bei -80°C aufbewahrt.

Die eigentliche Präparation von Gesamt-RNA aus *B. subtilis* erfolgte entweder nach der sauren Phenol Methode (Ambulos *et al.*, 1978) oder nach dem Protokoll der Firma Roche mit dem High Pure RNA Isolation Kit. Für die RNA-Isolierung mit der sauren Phenol Methode wurden die Zellen zum Zellaufschluss in flüssigem Stickstoff gekühlt und anschließend in einem Membrandisruptor 2 min bei 2600rpm mit Hilfe einer Teflonkugel zerkleinert. Das so entstandene Zellpulver wurde dann in 4 ml Lysispuffer (4 M Guanidinthiocyanat, 25 mM Natriumacetat pH 5,2 und 0,5% N-Lauroylsarcosin), vorgewärmt auf 50°C, aufgenommen und auf 4 Eppendorfcups à 1 ml aliquotiert. Jedes Cup wurde mit 1 ml saurem Phenolmix versetzt (Phenol pH 4,5-5:Chloroform:Isoamylalkohol; 25:24:1) und die Suspension wurde für 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Phasentrennung wurde durch fünfminütige Zentrifugation bei 21000 g beschleunigt und die Phenolextraktion wurde mit der wässrigen Phase (ca. 800 µl) wiederholt. Danach wurde die wässrige Phase mit Chloroform:Isoamylalkohol (24:1, v/v) versetzt und 5min geschüttelt. Die Suspension wurde ebenfalls zur

Phasentrennung zentrifugiert, die wässrige Phase wurde mit 0,1 Volumen einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) versetzt und die RNA wurde mit 2,5 Volumen 100 %igem Isopropanol präzipitiert. Nach einer 15 minütigen Zentrifugation bei 10000 g wurde die erhaltene RNA mit 70 % Ehanol gewaschen. Das RNA Pellet wurde dann in 30 µl DEPC behandeltem Wasser resuspendiert.

## **5.2 Aufreinigung von Nukleinsäuren**

### **5.2.1 Aufreinigung von DNA**

Die Aufreinigung von DNA erfolgte nach Protokollen der Firmen QIAGEN bzw. Promega. So wurden Plasmide deren Größe 3 kb überschritt über Säulchen der Firma QIAGEN gereinigt, kleinere Fragmente ausschließlich nach einer Vorschrift der Firma Promega. Zur Aufreinigung über Promegasäulchen wurde der zu reinigenden DNA 1 ml Resin zu gesetzt. Zur Herstellung von 100 ml Resin wurden 66,84 g Guanidinhydrochlorid in 33,3 ml Merlin III- Puffer (122,7 g/l Kaliumacetat; 71,4 ml/l Essigsäure) gelöst und auf 100 ml aufgefüllt, wobei der pH-Wert mittels 10 N NaOH auf 5,5 eingestellt wurde. Die so erhaltene Lösung wurde zunächst von Schwebstoffen durch Filtration befreit und anschließend mit 2 g Diatomeenerde (Celite) versetzt. Das Resin-DNA-Gemisch wurde für 15 min unter gelegentlichem Invertieren inkubiert, wodurch der Nukleinsäure die Adsorption an die Diatomenerde ermöglicht wurde. Über Filtersäulchen (Promega) wurde die Diatomenerde abgetrennt. Nach Waschen mit 2 x 2 ml Isopropanol (80 %; v/v) und anschließender Zentrifugation zum Entfernen der Isopropanolreste wurden 40 µl destilliertes Wasser auf die Säule gegeben und es erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C, zur Elution der DNA. Um das gesamte Eluat zu gewinnen, wurde für 1 min bei 14000 x g zentrifugiert. Die so erhaltene DNA wurde entweder direkt für Ligationen eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei - 20°C gelagert.

### **5.2.2 Aufreinigung von RNA**

Die Aufreinigung von RNA erfolgte nach Protokollen der Firmen QIAGEN (QIAGEN RNeasy Mini Kit).

### 5.3 Bestimmung der Konzentrationen von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von DNA und RNA wurde photometrisch (Ultrospec III, Amersham Biosciences, Freiburg) durch die Messung der Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt. Eine  $A_{260}$  von 1 entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml und einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Der Quotient der Absorptionen bei 260 nm (DNA) und 280 nm (Proteine) gibt Aufschluss über die Reinheit der DNA (Sambrook *et al.*, 1989). Oder die Konzentrationen wurden photometrisch mit einem NanoDrop<sup>®</sup>ND-1000 UV-Vis-Spektrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington USA) bestimmt.

### 5.4 DNaseI-Behandlung von RNA Proben

Die RNA-Proben werden zusammen mit DNaseI (Roche) und dessen Inkubationspuffer 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mittels PCR die Abwesenheit von DNA überprüft.

### 5.5 cDNA Synthese

Die cDNA Synthese erfolgte mittels reverser Transkriptase nach dem Protokoll von ABI (cDNA Archive Kit).

### 5.6 Klonierungstechniken

#### 5.6.1 Restriktion von DNA

Zur Restriktion wurden Ansätze von 20 - 50 µl Gesamtvolumen mit 100 – 500 ng DNA verwendet. Die Auswahl der Puffer sowie die Menge der eingesetzten Restriktionsendonukleasen, Reaktionstemperaturen und -zeiten entsprachen den Empfehlungen der Hersteller (Amersham Pharmacia, Freiburg, D; NEB, Ipswich, MA, USA; Fermentas Life Sciences, St. Leon-Roth, D). Die Analyse der Restriktionsfragmente erfolgte anschließend durch die Auftrennung in Agarosegelen.

#### 5.6.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in 20 µl Gesamtvolumen. Die Auswahl der Puffer, die Menge der eingesetzten Fragmente und Ligasen entsprach den Angaben der



Hersteller (Amersham Pharmacia, Freiburg, D; Roche, Mannheim, D; Fermentas Life Sciences, St. Leon-Roth, D).

### **5.6.3 Agarosegelelektrophorese**

Zur Auftrennung von DNA Fragmenten nach ihrer Größe wurden 1%ige Agarosegele in TAE-Puffer verwendet (Sambrook, *et. al.*, 1989). Die Auftrennung im großen Gel (100 ml) erfolgte bei 120 V und 500 mA, in kleinen Gelen (50 ml) bei 90 V und 500 mA. Als Größenstandard diente mit *Bst*EII geschnittene  $\lambda$ -DNA oder andere Größenstandards von Fermentas Life Sciences (St. Leon-Roth, D). Die Gele wurden in einer Ethidiumbromidlösung (1  $\mu$ g/ml) gefärbt und bei UV-Durchlicht mit einer Wellenlänge von 302 nm mit einer Video-Dokumentationsanlage (INTAS GmbH, Göttingen) fotografiert.

### **5.6.4 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR**

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde mittels PCR mit dem EasyStartKit 100 der Firma Molecular Bio Products (San Diego) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die verwendeten DNA-Polymerasen stammten von der Firma Eppendorf (Taq) und der Firma Finnzymes (Dynazyme ext, Phusion).

## **5.7 Transformation von Bakterien**

### **5.7.1 Transformation von *E. coli***

Der Stamm *E. coli* BL21 wurde mit jeweils 1  $\mu$ l Plasmid-DNA über Elektroporation (Gene-Pulser, Bio Rad) nach Herstellerangaben („Bacterial electrotransformation and pulse controler instruction manual. Version 1.0“) transformiert (Hanahan, 1983). Auch die Ligationsansätze wurden über Elektroporation in den Stamm DH5 $\alpha$  transformiert.

### **5.7.2 Transformation von *B. subtilis***

Für die Transformation von *B. subtilis* wird die in der stationären Phase auftretende natürliche Kompetenz ausgenutzt. Es wurde die „High Salt / Low Salt“-Methode angewendet (Harwood und Cutting, 1990), mit der Abwandlung, dass mit Bakterienkolonien von LB-Platten gearbeitet wurde. Die transformierten DNA-Mengen variierten zwischen 0,5 und 5  $\mu$ g.

Plattiert wurde auf Selektionsplatten mit den angegebenen Antibiotika-Konzentrationen für *B. subtilis*.

### 5.8 DNA-Sequenzierung

Die Bestimmung der Nucleotidsequenzen der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977). Dabei wurde das Cycle Reader<sup>TM</sup> Auto DNA Sequencing Kit (Fermentas, St. Leon-Roth, D) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. In die Sequenzreaktionen wurden jeweils 400 – 800 ng / Kilobase Template-DNA eingesetzt. Die fluoreszenzmarkierten Primer (Tabelle 16) stammten von der Firma MWG-Biotech GmbH (Martinsried, D) und wurden in einer Konzentration von 2 pmol / µl verwendet. Die Auftrennung der Reaktionsprodukte und deren Detektion erfolgte in einem Li-COR DNA-Sequenzer Modell 4000 (MWG-Biotech GmbH, Martinsried, D). Die Reaktionen wurden auf eine Sequenzgel aufgetragen, die aus Sequagel XR ultra pure und Sequagel complete ultra pure (Biozym, Hessisch Oldendorf, D) gegossen wurden. Für das Einlesen des Gellaufes und die anschließende halbautomatische Ermittlung der Sequenz wurde die ImageIR<sup>TM</sup> –Software von MWG-Biotech GmbH (Martinsried, D) benutzt. Der Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit der Ausgangssequenz erfolgte mit Hilfe des Programmes Vector NTI, InforMax. Einzelne Sequenzierungen wurden von der Firma MWG-Biotech GmbH (Martinsried, D) durchgeführt.

### 5.9 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Aus dem Genom von *B. subtilis* wurden mit Hilfe der Cy5-markierten Oligonukleotide unterschiedlich große, regulatorische Fragmente des *gbsAB*-Operons in einer PCR amplifiziert (Phusion Polymerase, Finnzymes). Parallel dazu wurde das Protein GbsR überproduziert und gereinigt.

In jedem Ansatz wurden unterschiedliche Mengen gereinigtes Protein und 250 ng des Cy5-markierten PCR Fragmentes in DNA-Bindepuffer (100mM TrisHCl pH 7,5; 150mM NaCl, 1mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 5% Glycerin, 50 µg/ml BSA; Filée *et al.*, 2001) inkubiert (30min, 37°C). Drei Negativkontrollen dienten zur Überprüfung der Methode: (1) eine Probe, die ohne Protein inkubiert wurde, (2) eine Probe, die mit einem anderen DNA-Fragment, welches nicht binden sollte inkubiert wurde und (3) eine Probe, die mit BSA inkubiert wurde. Anschließend wurden die Proben auf ein TAE-Polyacrylamidgel aufgetragen (8% Acrylamid) und in 1 x

TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt (25mA, 200V). Das Gel wurde dann auf einem Phosphorimager (Storm 860, Amersham Biosciences) gescannt (Red Fluorescence) und die erhaltenen Daten mit Hilfe der Image Quant<sup>TM</sup>-Software (Molecular Dynamics, Inc.) ausgewertet.

### 5.10 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion

In diesem Experiment wurden Oligonukleotide (siehe Tabelle 6) verwendet, mit denen ein Fragment mit einer Länge von etwa 100 Basenpaaren aus dem Zielgen amplifiziert wurde. Die Effizienz jedes Oligonukleotid-Paares wurde zunächst folgendermaßen bestimmt. Als Template wurde jeweils 1 µl genomischer DNA in den Konzentrationen 1 µg /µl eingesetzt. In den Ansatz wurden außerdem 12,5 µl SybrGreen PCR Master Mix der Firma Applied Biosystems (Darmstadt), 0,25 µl Oligonukleotid 1 (10 µM), 0,25 µl Oligonukleotid 2 (10 µM) und 11 µl Wasser gegeben. Es folgte die qPCR im 7300Real Time PCR System von Applied Biosystems (Darmstadt) gemäß dem in Tabelle 16 angegebenen Programm.

Nun erfolgte die eigentliche real-time Polymerase-Kettenreaktion. Der Ansatz entsprach dem oben genannten. Als Template wurde 1 µl cDNA eingesetzt, welche aus Zellen präpariert wurde, die unter verschiedenen Bedingungen gewachsen waren. Als Negativkontrollen dienten 1 µl RNA bzw. 1 µl Wasser. Es wurde eine qPCR gemäß Tabelle 14 durchgeführt. Die Dissoziationskurve wurde als Kontrolle aufgezeichnet, um die Schmelztemperatur des entstandenen Produkts zu überprüfen. Die Auswertung erfolgte durch Berechnung der Differenzen der mittleren Ct-Werte von cDNA aus Zellen, die mit Salz und/oder Cholin gewachsen waren und cDNA aus Zellen, die nur in 1x SMM gewachsen waren und somit als Referenz dienten.

**Tabelle 14 : Programm der qPCR.** Die Schritte 2 und 3 wurden 40-mal wiederholt.

Schritt1: Initiale Denaturierung	95°C	10 Minuten
Schritt 2: Denaturierung	95°C	15 Sekunden
Schritt 3: Anlagerung der Oligonukleotide/Polymerisation	60°C	1 Minute
Schritt 4: Denaturierung	95°C	15 Sekunden
Schritt 5: Aufzeichnung der Dissoziationskurve	60°C	20 Sekunden
Schritt 6: Denaturierung	95°C	15 Sekunden
Schritt 7: Aufbewahrung	4°C	

### 5.11 Analyse von mRNA-Startpunkten durch Primer Extension

Zur Analyse des Transkriptionsstartpunktes wurde Gesamt-RNA aus *B. subtilis* isoliert, wobei Kulturen verwendet wurden, die bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen inkubiert wurden. So wurden Kulturen bei 37°C mit 0.0 M NaCl, 0,4 M NaCl nach 10 min und 90 min sowie in 1 mM Cholin gewachsene Kulturen verwendet.

Der Reaktionsansatz für die Primer-Extension setzte sich wie folgt zusammen:

Annealing: 12-15 µg Gesamt-RNA  
1 µl PrimerEx1 (0,5 -5,0 µM; Tab.3)  
4 µl 5 x RT-Puffer (Promega)  
H<sub>2</sub>O ad 20 µl

Nach Zusammengeben der Komponenten erfolgte zunächst ein Denaturierungsschritt bei 75°C für 3 min im Eppendorf-Thermomixer. Dieser Schritt ist notwendig, damit die doppelsträngige RNA-Bereiche zur einzelsträngigen RNA aufschmelzen, was die Anlagerung des Primers ermöglicht. Im Thermomixer wurde der Ansatz anschließend auf 42°C abgekühlt.

Nach Abkühlen auf 42°C wurden zum Start der Reaktion folgende Komponenten zugegeben:

Reaktion : 1 µl dNTP-Mix (je 8 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP in 1 x AMV RTPuffer)  
10 Units AMV Reverse Transkriptase (Promega)

Der Reaktionsansatz wurde für 60min bei 42°C im Eppendorf-Thermomixer inkubiert. Nun erfolgte die Umschreibung von RNA in cDNA. Nach Ablauf der Inkubation wurden 175 µl TES zugegeben und die DNA durch Zugabe von 500 µl kaltem Ethanol und Lagerung für 30 min bei -70°C präzipitiert. Anschließend wurde für 30 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das zurückbleibende Pellet in 6 µl 1 x Stop-Puffer (CycleReader Auto DNA Sequencing Kit; Fermentas) resuspendiert. Vor der gelelektrophoretischen Auftrennung der Reaktionsprodukte auf dem Li-COR DNA-Sequencer Modell 4000 (MWG-Biotech GmbH, Martinsried) wurden die Produkte in 1 x Stopplösung verdünnt (1:2; 1:5) und für 5 min bei 95°C denaturiert. Dieses cDNA-Fragment wurde nun neben einer Sequenzreaktion, die mit demselben Primer durchgeführt wurde, auf ein Sequenzgel aufgetragen. Dies ermöglichte dann das Ablesen der Transkriptionsstartpunkte.

### 5.12 Computeranalysen

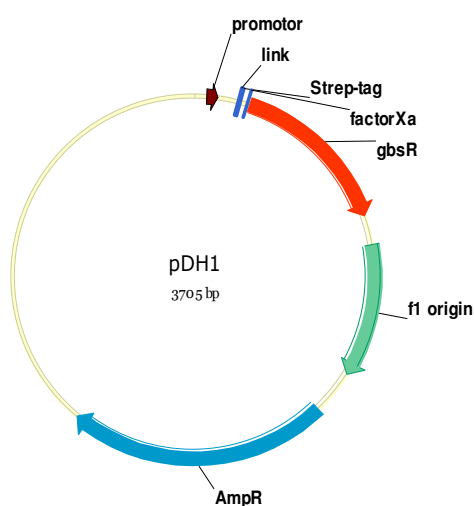
Datenbankvergleiche von Basen- und Aminosäuresequenzen mit bekannten Sequenzen wurden mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990) am National Center for

Biotechnology Information (NCBI) über das Internet durchgeführt. DNA-Sequenzanalysen wurden unter Verwendung der Software „Vector NTI 10.0“ der Firma Invitrogen (Carsbad, CA, USA) durchgeführt. Die Alignments mit Proteinsequenzen wurden mit ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) berechnet. Die Hervorsage des möglichen Helix-turn-Helix-Motives in GbsR wurden über das Internet durchgeführt (NPA@: Network Protein Sequence Analysis, <http://npsa-pbil.ibcp.fr> (Dodd &, Egan, 1990)).

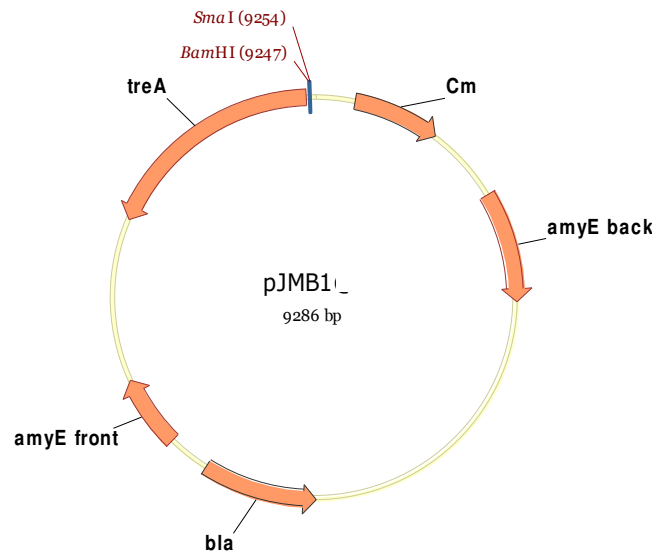
## 6. Konstruktion von Plasmiden und Stämmen

### 6.1 Plasmidkonstruktionen

**pDH1:** Dieses Expressionsplasmid wurde genutzt, um das Gen *gbsR* unter die Kontrolle des Tetracyclin- induzierbaren Promotors von pASK-IBA7 zu bringen. Zu diesem Zweck wurde das Gen *gbsR* mittels der Primer GbsR BsaI fwd und GbsR BsaI rev via PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde dann über die *BsaI*- Schnittstellen in den Primern in die *BsaI* site des pASK-IBA7-Vektors kloniert. Die Orientierung des *gbsR* Gens führt zur Expression des rekombinanten Proteins mit einem Strep-Tag an seinem N-Terminus (siehe Abb.7). Die korrekte Orientierung des Inserts und die DNA-Sequenz des *gbsR*-Gens wurden durch die Sequenzierung bestätigt.

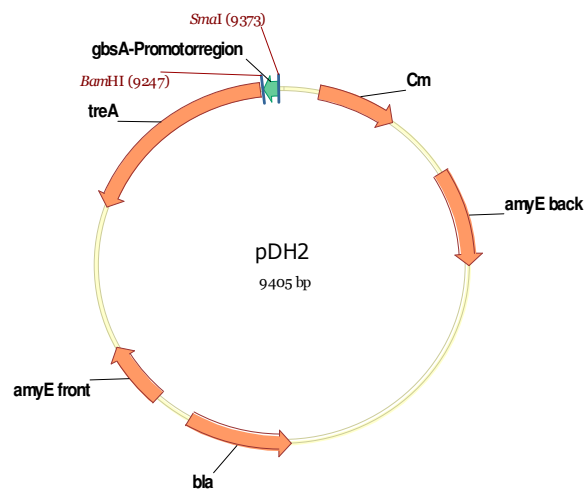


**Abbildung 7: Das Plasmid pDH1.** Dargestellt ist die Vektorkarte für das pASK-IBA7-Derivat, welches das *gbsR*-Gen unter der Kontrolle eines mit Anhydrotetracyclin induzierbaren *tet*-Promotors trägt. Das resultierende GbsR-Protein ist N-terminal mit einem Strep-tagII® zur Reinigung von GbsR versehen.



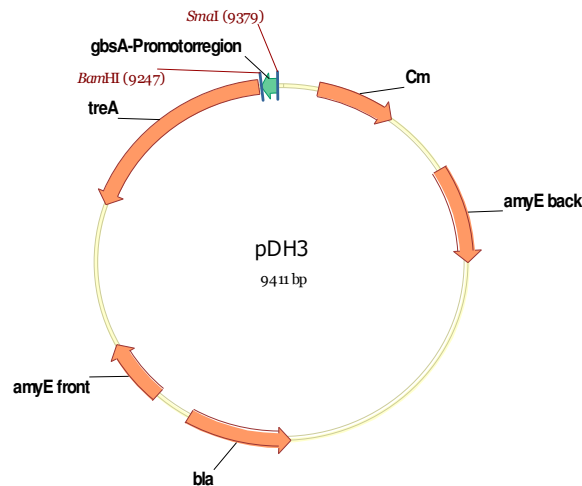
**Abbildung 8: Das Plasmid pJMB1.** Dargestellt ist die schematische Übersichtszeichnung des Plasmides pJMB1, der Ausgangsvektor für die *treA*-Fusionskonstrukte.

**pDH2:** Aus dem Genom von *B. subtilis* wurde ein 118 bp großes Fragment aus der *gbsA*-Promotorregion unter Verwendung der Primer cut1-SmaI-s und treA1a/BamHI via PCR amplifiziert. Dieses Fragment wurde mit *SmaI* und *BamHI* geschnitten und in den ebenfalls mit *SmaI* und *BamHI* linearisierten Vektor pJMB1 (Abb. 8) kloniert (siehe Abb.9).



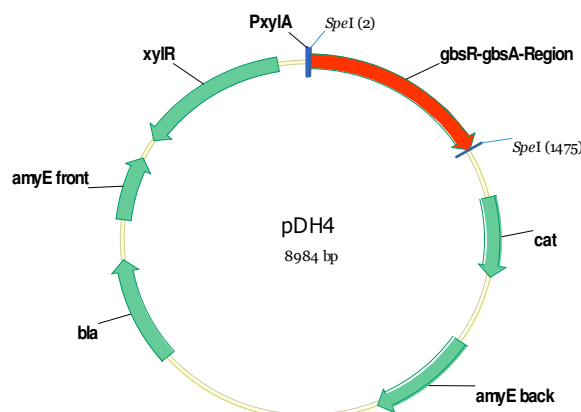
**Abbildung 9: Das Plasmid pDH2.** Gezeigt ist die Vektorkarte des pJMB1-Derivates, welches ein 118 bp großes Fragment aus der *gbsA*-Promotorregion trägt.

**pDH3:** Aus dem Genom von *B. subtilis* wurde ein 142 bp großes Fragment aus der *gbsA*-Promotorregion unter Verwendung der Primer *treA4/SmaI* und *cut1-BamHI*-as via PCR amplifiziert. Dieses Fragment wurde mit *SmaI* und *BamHI* geschnitten und in den ebenfalls mit *SmaI* und *BamHI* linearisierten Vektor pJMB1 kloniert (siehe Abb.10).



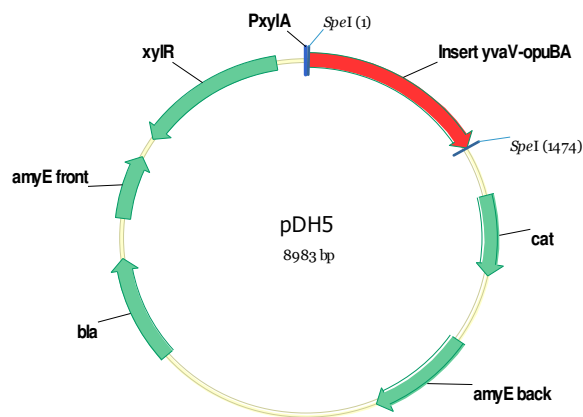
**Abbildung 10: Das Plasmid pDH3.** Gezeigt ist die Vektorkarte des pJMB1-Derivates, welches ein 142 bp großes Fragment aus der *gbsA*-Promotorregion trägt.

**pDH4:** Aus dem Genom von *B. subtilis* wurde ein 1467 bp großes Fragment aus der *gbsR-gbsA*-Promotorregion unter Verwendung der Primer *gbsR-PromA-sense1/SpeI* und *gbsR-PromA-antisense1/SpeI* via PCR amplifiziert. Dieses Fragment wurde mit *SpeI* geschnitten und in den ebenfalls *SpeI* restringierten Vektor pX kloniert (siehe Abb.11).



**Abbildung 11: Das Plasmid pDH4.** Gezeigt ist die Vektorkarte des pX-Derivates, welches ein 1467 bp großes Fragment aus der *gbsR-gbsA*-Promotorregion trägt.

**pDH5:** Aus dem Genom von *B. subtilis* wurde ein 1467 bp großes Fragment aus der *yuaV-opuBA*-Promotorregion unter Verwendung der Primer YvaV-opuBA-sense/SpeI und YvaV-opuBA-antisense/SpeI via PCR amplifiziert. Dieses Fragment wurde mit *SpeI* geschnitten und in den ebenfalls *SpeI* restringierten Vektor pX kloniert (siehe Abb.12).



**Abbildung 12: Das Plasmid pDH5.** Gezeigt ist die Vektorkarte des pX-Derivates, welches ein 1467 bp großes Fragment aus der *yuaV-opuBA*-Promotorregion trägt.

## 6.2 Stammkonstruktionen

### 6.2.1 Konstruktion von *treA*- Fusionsstämmen

Alle zur Konstruktion der *treA*- Reporter-genfusionsstämmen genutzten Plasmide sind Derivate des Plasmide pJMB1 (*treA*) und wurden durch doppelt homologe Rekombination in das chromosomale *amyE*-Gen der *B. subtilis*-Stämme GNB37 [JH642 (*treA::erm*)1] oder JBB8 [JH642  $\Delta$ (*gbsR::neo*) ] integriert. Um die komplette Integration der zirkulären Plasmide über einfache, homologe Rekombination zu verhindern, wurden diese vor der Transformation mit Restriktionsendonukleasen in dem nicht integrierenden Bereich linearisiert. Die Rekombinationen erfolgten zwischen plasmidcodierten 5'- und 3'- Bereichen von *amyE* und den entsprechenden Pendants auf dem Chromosom von *B. subtilis*. In den dadurch entstehenden Stämmen ist das chromosomale *amyE*-Gen durch die *treA*-Fusion und das *cat*-Gen unterbrochen. AmyE ist die  $\alpha$ -Amylase, mit deren Hilfe *B. subtilis* Stärke abbauen kann, das *cat*-Gen vermittelt die Resistenz gegen das Antibiotikum Chloramphenicol. Sämtliche Stämme wurden daher zunächst auf die Chloramphenicol selektioniert und dann auf den Verlust ihrer *amyE*-vermittelten Amylase-Aktivität überprüft.



Da in dieser Arbeit nur nichtcodierende Bereiche fusioniert wurden, musste bei der Konstruktion dieser transkriptioneller Fusionen der Leserahmen des *treA*-Gens nicht berücksichtigt werden.

**DHB2:** Zur Konstruktion von DHB2 [JH642  $\Delta$  (*treA::erm*)2 *amyE::* $\Phi$ (*gbsR-treA*)1] wurden kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes GNB37 [(*treA::neo*)1] mit dem mit *NheI* und *BsuI*5I linearisierten Plasmid pGNB10 transformiert.

**DHB3:** Zur Konstruktion von DHB3 [JBB8  $\Delta$  (*treA::erm*)2 *amyE::* $\Phi$ (*gbsR-treA*)1] wurden kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes GNB40 [(*gbsR::neo*)1  $\Delta$ (*treA::erm*)2 ] mit dem mit *NheI* und *BsuI*5I linearisierten Plasmid pGNB10 transformiert.

**DHB4:** Zur Konstruktion von DHB4 [JH642  $\Delta$  (*treA::erm*)2 *amyE::* $\Phi$ (*gbsA*`-*treA*)1] wurden kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes GNB37 [(*treA::neo*)1] mit dem mit *NheI* und *BsuI*5I linearisierten Plasmid pDH2 transformiert.

**DHB5:** Analog zu DHB4; transformiert wurde das mit *NheI* und *BsuI*5I linearisierte Plasmid pDH3.

**DHB6:** Zur Konstruktion von DHB6 [JH642 (pDH4)] wurden kompetente Zellen des *B. subtilis* Stammes JH642 [*trpC2 pheA*1] mit dem Plasmid pDH4 transformiert.

**DHB8:** Analog zu DHB6; transformiert wurde das Plasmid pDH5.

**DHB12:** Zur Konstruktion des Stammes DHB12 [JBB8  $\Delta$  (*treA::erm*)2 *amyE::* $\Phi$ (*gbsA*`-*treA*)1] wurden kompetente Zellen des Stammes DHB4 mit chromosomaler DNA des *B. subtilis* Stammes JBB8 transformiert.

**DHB13:** Zur Konstruktion des Stammes DHB13 [JBB8  $\Delta$  (*treA::erm*)2 *amyE::* $\Phi$ (*gbsA*`-*treA*)2] wurden kompetente Zellen des Stammes DHB5 mit chromosomaler DNA des *B. subtilis* Stammes JBB8 transformiert.

## 7. Biochemische Methoden

### 7.1 Quantifizierung der Phospho- $\alpha$ -(1,1)-Glucosidase (TreA)-Aktivität

Die *treA*-Fusionsstämme ermöglichen eine Charakterisierung der Regulation des *gbsAB*-Operons, *opuB*-Operons und *opuC*-Operons. Das hier verwendete Reportergen *treA* kodiert für eine salztolerante Phospho- $\alpha$ -(1,1)-Glucosidase (TreA) aus *B. subtilis* (Gotsche & Dahl, 1996; Schöck *et al.*, 1996).

Die Kulturen wurden bei 37°C und 220 rpm in einem Wasserbad inkubiert, bis sie eine OD<sub>578</sub> von 0,25 erreicht hatten. Zu diesem Zeitpunkt wurde die erste Probe entnommen, deren optische Dichte ermittelt und den Kulturen Cholin (1 mM) und/ oder NaCl (0,4 M) zugesetzt. Nach definierten Zeitpunkten wurden weitere Proben entnommen (1,5 ml). Die Zellen wurden durch Zentrifugation in einer Eppendorffzentrifuge geerntet und das Pellet bis zur Verwendung bei -20°C tiefgefroren. Die eingelagerten Pellets wurden zunächst in 500 µl Z-Puffer (Gotsche & Dahl, 1996; Helfert *et al.*, 1995) mit Lysozym (1 mg/ml) resuspendiert. Dabei ist zu beachten, dass der Z-Puffer dahingehend modifiziert war, dass dieser kein  $\beta$ -Mercaptoethanol enthält. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei 37°C in einem Eppendorf-Thermomixer. Zelltrümmer wurden anschließend bei 14000rpm abzentrifugiert. 400 µl des klaren Überstands wurden mit 400 µl Z-Puffer (ohne Lysozym) versetzt und die Reaktion mit 200 µl para-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-Glucopyranosid (PNPG; 4 mg/ml in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5) gestartet. Die Reaktionsansätze wurden schließlich bei 28°C im Wasserbad inkubiert, bis eine schwache Gelbfärbung auftrat, längstens allerdings 3 h. Durch Zugabe von 500 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (1M) wurde die Reaktion abgestoppt, die Lösung in eine Küvette überführt und die Extinktion bei 420 nm (E<sub>420</sub>) photometrisch ermittelt. Die Reaktionsdauer wurde exakt notiert. Die TreA-Enzymaktivität A<sub>TreA</sub> ergibt sich wie folgt (Gotsche & Dahl, 1996; Helfert *et al.*, 1995):

Dabei ist:

$$A_{\text{TreA}} = 1500 * E_{420} * (OD_{578} * V * t * 0,1 * 0,8)^{-1}$$

A<sub>TreA</sub>: die spezifische TreA-Enzymaktivität in nmol umgesetztes PNPG pro min und mg TreA-Protein [ nmol ' min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> = Miller units pro mg Protein]

E<sub>420</sub>: Extinktion des Spaltproduktes *para* - Nitrophenol bei 420 nm

OD<sub>578</sub>: optische Dichte der Bakteriensuspension bei 578 nm

V:                abzentrifugiertes Zellkulturvolumen in ml  
t:                Reaktionszeit in min

Der Faktor  $1500 [mmol * mg^{-1} * ml]$  berücksichtigt den Extinktionskoeffizient von *p* - Nitrophenol ( $\epsilon_{405} = 18300 M^{-1} * cm^{-1}$ ) die Schichtdicke von 1cm, das Reaktionsvolumen von 1,5 ml sowie die Definition, dass eine voll induzierte Kultur eine Aktivität von 1000 Miller units/mg Protein aufweist. Es wird dabei davon ausgegangen, dass eine OD<sub>578</sub> von 1 einer Proteinkonzentration von 1 mg /ml entspricht. Dem Verdünnungsfaktor VF liegt das Volumen des eingesetzten Zelllysats zugrunde, demnach ist VF bei Einsatz von 400µl Zelllysats mit 0,8 einzuberechnen.

## 7.2 Amylase-Test

Zur Kontrolle der stabilen Insertion der *treA*-Reporterfusionen in das *amyE*-Gen wurde der Nachweis für aktive  $\alpha$ -Amylase geführt. Dazu wurde der zu untersuchende Stamm auf einer LB-Platte mit 1% Stärke plattiert und über Nacht inkubiert. Die bewachsene Platte wurde dann mit Gram-Jodlösung (0,5% (w/v) Jod, 1% Kaliumjodid) geflutet und die Kolonien von der Platte gespült. Der Überstand wurde verworfen. Bei *amyE*<sup>+</sup>-Zellen, also *B. subtilis*-Zellen, die die *treA*-Fusion nicht integriert haben und somit noch in der Lage sind Stärke anzubauen, wurde ein heller Hof sichtbar, in dem keine Stärke mehr vorhanden war, die vom Jod komplexiert werden konnte. Bei *amyE*<sup>-</sup>-Zellen, *B. subtilis*-Zellen, die die *treA*-Fusion ins Chromosom integriert haben und somit nicht mehr in der Lage sind Stärke abzubauen, blieb alles in der dunkelvioletten Farbe des Jod-Stärke-Komplexes.

## 7.3 Protein-Gelelektrophoresen unter denaturierenden Bedingungen

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) wurde zur Bestimmung der molekularen Masse und der Überprüfung der Reinheit der isolierten Proteine genutzt. Der Gellauf wurde in Elektrophorese-Kammern von Biorad durchgeführt. 15%ige Mini-Gele (8,0 x 6,0 x 0,1 cm<sup>3</sup>) setzten sich wie in Tabelle 15 beschrieben zusammen. Die Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer (62,5 mM Tris/HCl pH 6,8; 4% (w/w) SDS; 4% (w/v) 2-Mercaptoethanol, 17,4% (w/v) Glycerin und 0,002% (w/w) Bromphenolblau) auf eine Konzentration von ca. 2,5 mg/ml eingestellt. Die Denaturierung erfolgte für 5 min bei 95°C gefolgt von 2 min bei einer rpm von 1000

schüttelnd im Thermocycler. Pro Spur wurden 20-40 µl aufgetragen. Als Elektrodenpuffer diente Tris/HCl-Puffer (25 mM Tris/HCl pH 8,8; 192 mM Glycin und 0,1% (w/v) SDS. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 120-200 V für ca. eine Stunde. Als Standard zur Bestimmung der Molekulargewichte der getrennten Protein wurde der „Page Ruler Protein Marker“ (Fermentas Life Science, St. Leon-Roth, D) verwendet (14-70 kDa). Die Gele wurden anschließend in einer aus 0,25% (w/v) Coomassie<sup>TM</sup> Brilliant Blue G250 (Merck, Darmstadt), 50% (v/v) Isopropanol und 5% (v/v) Essigsäure bestehenden Lösung gefärbt. Dazu wurde das Gel für einige Sekunden in der Mikrowelle erhitzt und anschließend für 10 weitere min in der Färbelösung belassen. Die Entfärbung erfolgte ebenfalls nach kurzem Erhitzen in der Mikrowelle für einige Zeit auf dem Schüttler. Der Entfärber setzte sich wie folgt zusammen: 50% (w/v) Isopropanol, 5% Eisessig, 45% destilliertes Wasser.

**Tabelle 15:** Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele

Lösung	Trenngel (15%)	Sammelgel
1,5 M Tris/HCl pH 8,8; 13,8 mM SDS	2,5 ml	–
0,5 M Tris/HCl pH 6,8; 13,8 mM SDS	–	2,5 ml
Acrylamid:Bisacrylamid (37,5:1) (40% ig)	5,0 ml	1,1 ml
Destilliertes Wasser	2,5 ml	6,5 ml
TEMED (100% ig)	20 µl	20 µl
APS (10% ig)	40 µl	40 µl

#### 7.4 Protein-Gelelektrophoresen unter nativen Bedingungen

Die native Proteingelelektrophorese wurde zur Bestimmung der molekularen Masse unter nativen Bedingungen genutzt. Der Gellauf wurde in Elektrophorese-Kammern von Biorad durchgeführt. Benutzt wurden Ready-Gels (4-20% Tris\*HCl) von BioRad. Die Proteinproben wurden mit einem Probenpuffer (25 mM Tris/HCl pH 8,3; 192 mM Glycin 17,4% (w/v) Glycerin) auf eine Konzentration von ca. 1 µg eingestellt. Pro Spur wurden 10-20 µl aufgetragen. Als Elektrodenpuffer diente Tris/HCl-Puffer (25 mM Tris/HCl pH 8,3 und 192 mM Glycin). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Stromstärke von 5-10 mA für ca. 16 Stunden. Als Standard zur Bestimmung der Molekulargewichte der getrennten

Protein wurde der „HMW-Native Protein Marker“ (GE Healthcare) verwendet (66-669 kDa). Die Banden wurden anschließend mit der Silberfärbemethode nach Blum *et al.* (1987) detektiert.

### 7.5 Proteinbestimmung mittels Absorptionsmessung

Die Proteinkonzentrationen wurden photometrisch bestimmt. Über das molekulare Gewicht und die Aminosäuresequenz wird der Molare Extinktionskoeffizient eines Proteins errechnet. Dieser gibt Aufschluss darüber, welche Proteinkonzentration einer Absorption von eins bei 280 nm entspricht. Über die Messung der Absorption ( $A_{280}$ ) kann also die Proteinkonzentration bestimmt werden. Oder die Konzentrationen wurden photometrisch mit einem NanoDrop<sup>®</sup>ND-1000 UV-Vis-Spektrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington USA) bestimmt.

### 7.6 Überexpression und Reinigung von GbsR aus *B. subtilis*

#### 7.6.1 Überexpression von GbsR aus *B. subtilis*

GbsR aus *B. subtilis* wurde in *E. coli* heterolog überexprimiert. Das Gen *gbsR* lag auf dem Plasmid pDH1 vor, einem pASK-IBA7-Derivat (IBA, Göttingen, D). Das Plasmid trug das *gbsR*-Gen unter der Kontrolle eines mit Anhydrotetracyclin induzierbaren Promotors. Es folgt die Sequenz für einen Strep-tagII<sup>®</sup> (Voss & Skerra, 1997), über den das produzierte Protein anschließend mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden konnte. Zwischen diesen Basensequenzen liegt eine kurze Sequenzfolge, die im Protein später eine Proteaseschnittstelle für den FactorXa (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, D) ergab. Mittels dieser Schnittstelle kann ggf. der Strep-tagII<sup>®</sup> vom Protein abgeschnitten werden. Die Überproduktion des GbsR-Proteins erfolgte über die Induktion des *tet*-Promotors mittels Anhydrotetracyclin-Zugabe. Die Überproduktion wurde in 6 L MMA (6 x 1 l in 2 l Erlenmeyerkolben) mit Ampicillin durchgeführt. Der Kulturkolben wurde mit einer zuvor gezogenen Übernachtskultur auf eine OD<sub>578</sub> von 0,1 angeimpft. Diese Kultur wurde bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,5 gezogen und durch Zugabe von 500 µl Anhydrotetracyclin (Endkonzentration: 0,2 µg/ml) die Produktion des GbsR induziert. Nach eineinhalb bis zwei Stunden wurde die Kultur durch Zentrifugation abgeerntet und das gewonnene Zellpellet anschließend bei -20°C gelagert.

### 7.6.2 Zellaufschluss mittels „French Press“

Die “French Press” (French® Pressure Cell Press; American Instrument Company, Division of Travenol Laboratories inc., Silver Spring, Maryland 20910) bietet die Möglichkeit, größere Volumen von Zellsuspension (20 ml in Druckzelle 40 K) innerhalb kurzer Zeit aufzuschließen. Das Prinzip des Aufschlusses beruht darauf, dass sich zunächst ein hoher Druck in der Druckzelle, in der sich die Zellsuspension befindet, aufbaut. An diesen passen sich die Zellen an. Durch das Öffnen des Auslaufventils wird der Außendruck für die ausströmenden Zellen schlagartig erniedrigt, sodass sie durch den nun zu hohen Innendruck platzen. Die geernteten Zellen werden zuerst in einem Aufschlusspuffer (100mM Tris\*HCl pH 7,5, 2,5 % Glycerin, 2 mM DTT, 0,4 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM Benzamidine) resuspendiert und dann in die auf dem Kopf stehende Druckzelle (auf 4°C vorgekühlt) gefüllt und diese durch aufsetzen des Bodenteil mit eingesetztem Auslassröhrchen verschlossen. Im Anschluss wurde die Druckzelle mit dem Kolben nach oben in die „French Press“ eingesetzt. Daraufhin wurde ein Pumpendruck von ca. 1000 Pa angelegt. Das Auslassventil wurde stoßweise geöffnet und die ausströmenden, lysierten Zellen in einem Falcon gesammelt. Das Verfahren wurde 3- bis 4-mal durchgeführt, um eine möglichst vollständige Lyse der Zellen zu erreichen. Zum Schluss wurde die lysierte Zellsuspension bei 35000 rpm und 4°C für 1 h in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert, der Überstand dekantiert und bei 4°C gelagert.

### 7.6.3 Reinigung von GbsR über FPLC-Chromatographie

Das Extrakt aus 7.6.2 wurde mittels eines Loops auf eine mit 100 ml 100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5 equilibrierte StrepTactin-Säule (IBA, Göttingen, D) (Säulenvolumen: 10 ml) (Voss & Skerra, 1997) aufgetragen. Der verwendete Puffer wurde zuvor filtriert, um ein Verstopfen der Säule durch größere Partikel zu vermeiden. Nach dem Auftrag wurde die beladene StrepTactin-Säule mit ca. 10 Säulenvolumina desselben Puffers gewaschen, um nicht gebundenes Protein von der Säule zu entfernen. Zur Elution wurden 30 ml 100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5 mit 2,5 mM Desthiobiotin (Acros Organics, Geel, B; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) verwendet. Das Desthiobiotin hat eine höhere Affinität zum Säulenmaterial als der Strep-tagII des Proteins und verdrängt damit das Protein von der Säule. Das Eluat wurde in 3 ml Fraktionen gesammelt. Die Regeneration des Säulenmaterials erfolgte mit 150 ml 100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5 mit 1 mM HABA (4-Hydroxyazobenzen-2-Carboxy-Säure) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D), die das Desthiobiotin von der Säule löst. Anschließend wurde die Säule mit 100 ml 100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5 gewaschen und damit wieder für die nächste Reinigung

vorbereitet (Strep-tag II-System, Arbeitsanleitung, IBA, Göttingen, D). Die aufgefundenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf das Vorhandensein des GbsR überprüft. Das Protein fand sich in den Fraktionen 3-6. Bei Bedarf wurden die Fraktionen mit GbsR über Membranen mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa (VivaSpin Columns, VivaScience Ltd., Stonehouse, UK) ankonzentriert.

#### **7.6.4 Dialyse des gereinigten GbsR-Proteins**

Mittels SDS-PAGE wurden die Fraktionen bestimmt, die das GbsR-Protein enthielten. Sie wurden vereinigt und über Nacht gegen 5 L 10 mM Tris/HCl, pH 7 in einem vorgequollenen Dialyseschlauch (ZelluTrans, Ø trocken: 15,9 mm, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D) bei 4°C dialysiert. Am nächsten Morgen wurde eine Konzentrationsbestimmung der Probe, wie oben beschrieben, durchgeführt. Mit dem so gereinigten Protein wurden alle fluoreszenzspektroskopischen Messungen durchgeführt.

### **7.7 Größenbestimmung des GbsR-Proteins**

#### **7.7.1 Gelfiltration**

Die relative molekulare Masse von GbsR wurde mit Hilfe der Gel-Filtrationschromatographie unter Verwendung einer HiLoad Superdex75 (16/60) Säule bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot der gereinigten GbsR-Fraktion auf die Säule aufgetragen, welche vorher mit 100 mM Tris\*HCl, 150 mM NaCl (pH 7,5) Puffer äquilibriert wurde.

Zum Eichen der Säule wurden folgende Markerproteine nach Vorschrift einer Vorschrift von SIGMA (Gel Filtration Molecular Weight Markers) verwendet: Cytochrom C (12,5 kDa), Carbonsäure Anhydrase (29 kDa), Rinderserum Albumin (66 kDa) und Alkohol Dehydrogenase (150 kDa).

### **7.8 Fluoreszenzspektroskopische Bestimmung der Bindungsaffinität ( $K_D$ ) des GbsR-Proteins für die Substanzen Glycinbetain und Cholin**

Um die Bindungsaffinitäten des GbsR Proteins für die Substanzen Glycin Betain, Glycin Betain Aldehyd und Cholin zu bestimmen, wurde ein fluoreszenzspektroskopischer Assay genutzt. Die Bindungsaffinitäten wurden über die intrinsische Tryptophanfluoreszenz des GbsR Proteins bestimmt. Es wurde mit einem Fluoreszenzphotometer (Cary Eclipse,

VARIAN, Palo Alto, CA, USA) ein Emissionsspektrum von 300 nm bis 450 nm aufgezeichnet. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm, da bei dieser Wellenlänge spezifisch Tryptophane zur Emission angeregt werden. Die Spaltweite zum Austritt des Lichtes zur Anregung der Proteine betrug 5 nm. Gleichbleibende Messbedingungen wurden über ein Kühlsystem garantiert, mit dem die Messkammer im Photometer auf 25°C temperiert werden konnte. Zu 1 ml GbsR Protein (5 µM (Es wurde angenommen, dass GbsR als Dimer mit je einer Ligandenbindestelle vorlag.)) in 10 mM Tris-HCl [pH7]) wurden unterschiedliche Mengen an Substrat titriert. Eine Änderung der Fluoreszenz wurde nach ca. einer Minute Inkubationszeit über die erneute Aufzeichnung eines Emissionsspektrums detektiert. Über den Vergleich der Emissionsspektren für die Proteinprobe ohne und mit Substrat konnten Verschiebungen der maximalen Emissionswellenlänge und Änderungen in der Fluoreszenzintensität über einen automatischen „Peak Search“ festgestellt werden. Die Bindungsaffinität des GbsR zu seinen Substraten wurde über die Änderung der Fluoreszenzintensität bestimmt. Diese Änderungen folgten den Gesetzmäßigkeiten einer Sättigungskurve der folgenden Formel:

$$F = F_0 + (\Delta F * [S_0]/([S_0] + K_D))$$

F	=	theoretische Fluoreszenzintensität für eingesetzte Substratkonzentration
F <sub>0</sub>	=	gemessene Fluoreszenzintensität ohne Substrat
ΔF	=	maximale Änderung der Fluoreszenzintensität
S <sub>0</sub>	=	bei dieser Messung eingesetzte Substratkonzentration
K <sub>D</sub>	=	Bindungskonstante, Maß für die Affinität eines Proteins zu seinem Substrat; gibt an, bei welcher Substratkonzentration das Protein halbmaximal mit Substrat abgesättigt ist

Die Analyse und Auswertung der Daten erfolgte, mit dem Programm GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego CA, USA). Bei der Berechnung der K<sub>D</sub> wurde der Hill-Koeffizient mit einbezogen.



## IV. Ergebnisse

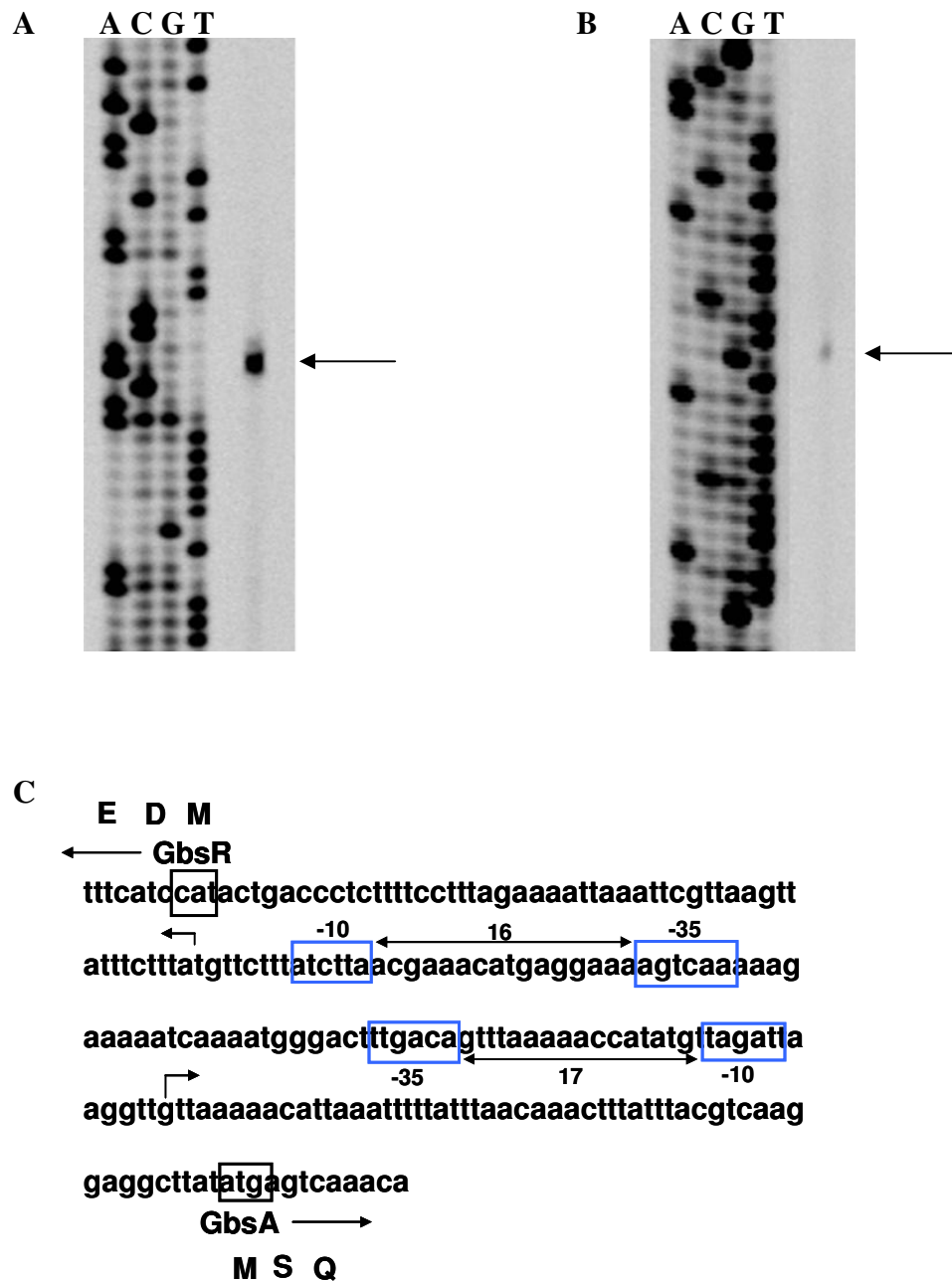
### 1. Regulation der Glycin Betain Synthese

#### 1.1 Regulation des *gbsAB*- Operons

##### 1.1.1 Bestimmung der mRNA-Startpunkte der *gbsR*- und *gbsAB*- Transkripte

Zur Festlegung der Promotorsequenz von *gbsR* und *gbsAB* wurde der Transkriptionsstartpunkt durch Primer-Extension-Analyse kartiert. Dazu wurden die *Bacillus subtilis*-Zellen in SMM bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,25 gezogen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,4 M NaCl und 1 mM Cholin zu den Kulturen. Nach 90 Minuten wurden die Zellen geerntet und die Gesamt-RNA daraus isoliert. Diese diente als Matrize in der Primer Extension Reaktion. Als Primer wurde ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD800 markiertes, *gbsR*-spezifisches Oligonukleotid (PE-*gbsR*2) und ein *gbsA*-spezifisches Oligonukleotid (PE-*gbsA*2) benutzt. Die mRNA wurde mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Unter Verwendung derselben Oligonukleotide (PE-*gbsR*2; PE-*gbsA*2) wurde eine Sequenzierreaktion mit dem Plasmid pDH4 als Matrize durchgeführt, welches die *gbsR*-*gbsAB*-Genregion enthält. Diese Sequenzierungsreaktion wurde als Größenstandard neben den Produkten der reversen Transkription in einem Sequenziergel aufgetrennt und mit Hilfe eines Licor DNA-Sequenzer analysiert (Abb.13).

Vor dem identifizierten Startpunkt des *gbsR*-Transkriptes sowie in der näheren Umgebung des Initiationspunktes des *gbsA*-Transkriptes befinden sich in den bestimmten Sequenzen jeweils eine potentielle -10 und -35 Region mit 16 bp (*gbsR*) bzw. 17 bp (*gbsA*) Abstand zueinander, welche als Erkennungsstelle für den vegetativen Sigmafaktor  $\sigma^A$  aus *B. subtilis* dienen könnte (Haldenwang, 1995). Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Versuchen zur Bestimmung der der mRNA-Startpunkte des *gbsR*-Gens und des *gbsAB*-Operons überein (Boch *et al.*, 1996; Nau-Wagner, 1999).



**Abbildung 13: Primer Extension-Analyse der *gbsR-gbsAB*-Promotorregion.**

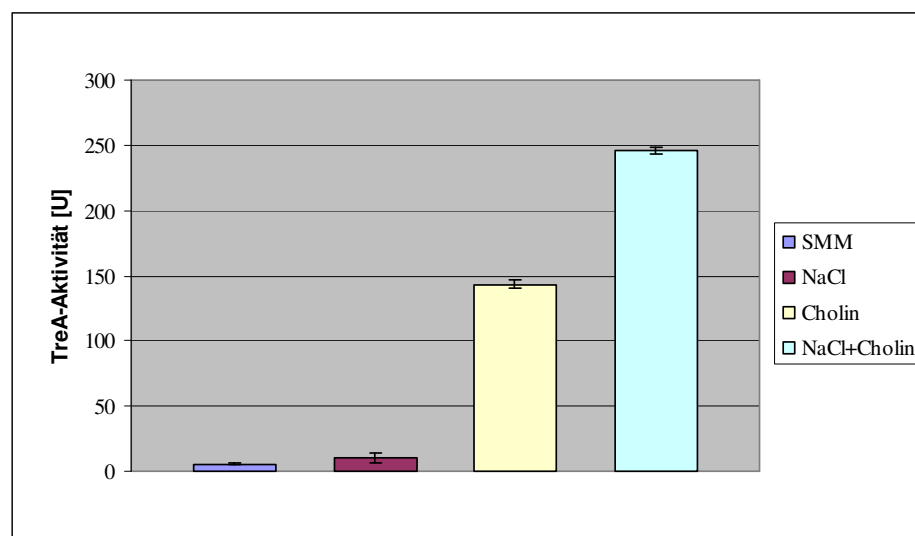
Identifikation des transkriptionellen Startpunktes des *gbsR-gbsAB*-Operons von *B. subtilis* und Analyse des potentiellen Promotors. *B. subtilis* wurde in Minimalmedium bei 37 °C kultiviert, bis die Kultur eine OD<sub>578</sub> von 0,25 erreichte. Dann erfolgte die Zugabe von 0,4 M NaCl und 1mM Cholin. Nach 90 min wurden die Zellen geerntet. Jeweils 20µg der isolierten Gesamt-RNA wurden mit einem *gbsA*-spezifischen DNA-Primer (**A**) und mit einem *gbsR*-spezifischen Primer (**B**) von einer reversen Transkriptase in cDNA transkribiert. Dieses Reaktionsprodukt wurde neben einer DNA-Sequenzierungsreaktion die mit denselben Oligonukleotiden erhalten wurden, in einem Sequenziergel aufgetrennt. (**C**) Nukleotidsequenz der *gbsR-gbsAB*-Promotorregion aus *B. subtilis*. Die Initiationsstelle der Transkription ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die -10 und -35 Region des potentiellen  $\sigma^A$  abhängigen Promotors sind mit einem Rahmen um die jeweiligen Nukleotide markiert.

### 1.1.2 Regulation der Expression des *gbsAB*-Operons

Für die Regulationsstudien wurde hauptsächlich der *B. subtilis*-Stamm GNB45 benutzt, ein Stamm in dem die *gbsA*-Promotorregion (914 bp) mit dem Reportergen *treA*, welches für eine salztolerante Phospho- $\alpha$ -(1,1)-Glucosidase aus *B. subtilis* kodiert (Schöck & Dahl, 1996), fusioniert ist (Nau-Wagner, 1999). Diese Reportergenfusion ist am *amyE*-Genort in das *B. subtilis* Genom als Einzelkopie integriert und wurde unter verschiedenen Wachstumsbedingungen und in verschiedenen Stammhintergründen untersucht.

#### 1.1.2.1 Einfluss von Cholin und hoher Osmolarität auf die *gbsAB*-Expression

*B. subtilis* ist in der Lage die osmotische Schutzsubstanz Glycin Betain zu synthetisieren, wenn die Vorstufe Cholin im Nährmedium vorhanden ist (Boch *et al.*, 1994). In der Arbeit von Nau-Wagner (1999) wurde gezeigt, dass nur Cholin, nicht aber eine hohe Osmolarität, einen Einfluss auf die *gbsAB*-Expression aufweist. Um dies weiter zu untersuchen, wurde der Stamm GNB45, welcher eine intakte *gbsR*- und *gbsA*-Kopie besitzt, bei 37°C und 220 rpm in SMM-Medium bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,25 gezogen und eine Probe für den TreA-Test abgenommen. Anschließend wurde zu den Kulturen 0,4 M NaCl, 1 mM Cholin oder 0,4 M NaCl und 1 mM Cholin zugesetzt. Nach 90 Minuten wurden Proben genommen und die TreA-Aktivität bestimmt. Abbildung 14 zeigt die Induktion der *gbsA-treA*-Fusion



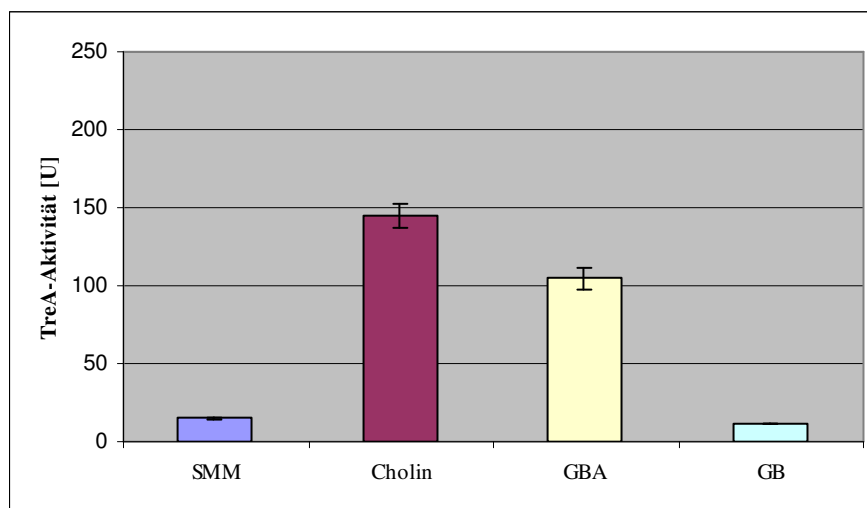
**Abbildung 14: Induktion des *gbsAB*-Operons.**

Dargestellt sind die TreA-Aktivitäten des Stammes GNB45 (*gbsA-treA*) in Abhängigkeit verschiedener Induktionsbedingungen: SMM (■), SMM + 0,4 M NaCl (■), SMM+ 1mM Cholin (■) und SMM + 0,4 M NaCl + 1mM Cholin (■).

Es konnte bestätigt werden, dass eine Zugabe von 0,4 M NaCl zum Wachstumsmedium keinen Einfluß auf die TreA-Aktivität des Stammes GNB45 (Abb.14) hat. Durch die Zugabe von 1 mM Cholin zum Wachstumsmedium steigt die TreA-Aktivität nach 90 min um das 30 fache auf 143 U an. Bei einer Zugabe von 0,4 M NaCl und 1 mM Cholin zum Wachstumsmedium, konnte eine TreA-Aktivität von 246 U detektiert werden. Diese Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass das *gbsAB*-Operon durch die Zugabe von Cholin und nicht durch hohe Osmolarität induziert wird. Die erhöhte TreA-Aktivität nach der kombinierten Zugabe von 0,4 M NaCl und 1 mM Cholin zum Medium resultiert aus dem gesteigerten Cholin-Transport, verursacht durch die hohe Osmolarität (Boch *et al.*, 1994; Kappes *et al.*, 1999).

#### 1.1.2.2 Bestimmung möglicher weiterer Induktoren für das *gbsAB*-Operon

Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob auch das Zwischenprodukt Glycin Betain Aldehyd und das Endprodukt Glycin Betain die Expression des *gbsAB*-Operons induzieren kann. Der Stamm GNB45 wurde in Minimalmedium bei 37°C und 220 rpm inkubiert und nach Erreichen von einer OD<sub>578</sub> von 0,25 mit 1 mM Cholin, 1 mM Glycin Betain Aldehyd oder mit 1 mM Glycin Betain versetzt (Abb. 15). Nach 90 Minuten wurden Proben entnommen und die TreA-Aktivität bestimmt.



**Abbildung 15: *gbsAB*-Expression in Abhängigkeit verschiedener möglicher Induktoren.**

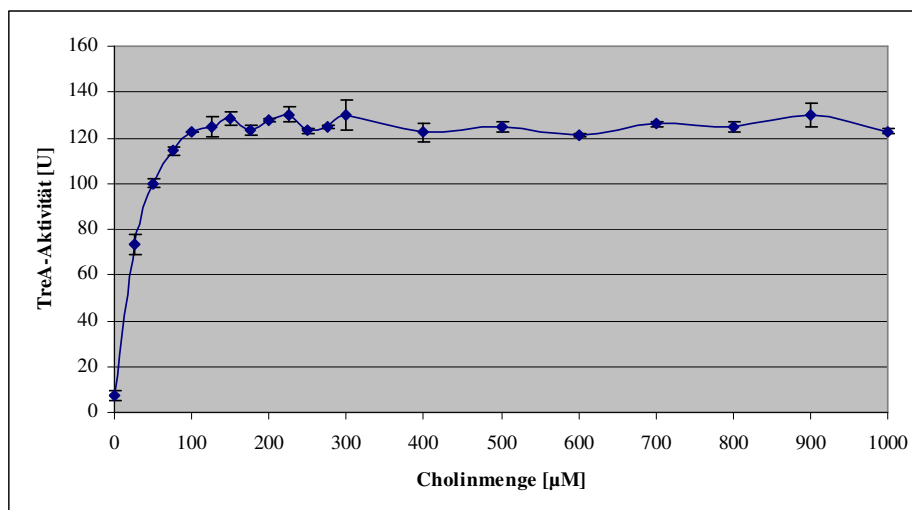
Dargestellt ist die TreA-Aktivität des *B. subtilis* Stammes GNB45 (*gbsA-treA*) 90 Minuten nach Zugabe von 1 mM Cholin (■), 1 mM Glycin Betain Aldehyd (●) oder 1 mM Glycin Betain (●).

Durch die Zugabe der Glycin Betain Vorstufe Cholin zum Wachstumsmedium des Stammes GNB45 konnte nach 90 Minuten eine TreA-Aktivität von 147 U und somit eine Induktion

bestimmt werden. Nach Zugabe von Glycin Betain konnte keine erhöhte TreA-Aktivität festgestellt werden. Das Endprodukt des Glycin Betain Syntheseweges kann also die Expression des *gbsAB*-Operons nicht induzieren. Glycin Betain Aldehyd weist ebenfalls eine erhöhte TreA-Aktivität auf (110 U). Das Zwischenprodukt der Glycin Betain Synthese aus Cholin induziert demnach auch die Expression des *gbsAB*-Operons. Dies ist von großer Relevanz, da Glycin Betain Aldehyd für die Zelle toxisch ist. Somit muss dieser schnell zu Glycin Betain umgesetzt werden.

### 1.1.2.3 Bestimmung der minimalen Induktorkonzentration

Zur Identifizierung der minimalen Cholinkonzentration, welche benötigt wird, um die maximale Expression des *gbsAB*-Operons unter niederosmolaren Bedingungen zu induzieren, wurde der Stamm GNB45 in SMM-Medium bei 37°C und 220 rpm in einem Wasserbad inkubiert. Bei einer OD<sub>578</sub> von 0,25 erfolgte die Zugabe unterschiedlicher Cholinkonzentrationen (0-1 mM). 90 Minuten nach der Zugabe wurden Proben entnommen und die TreA-Aktivität bestimmt (Abb. 16).



**Abbildung 16: Abhängigkeit der *gbsAB*-Induktion von der Cholinkonzentration.**

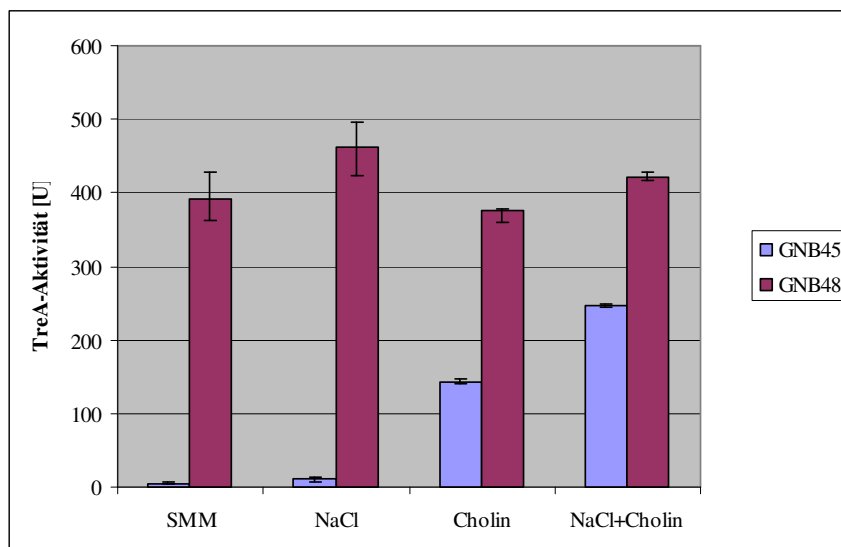
In Abbildung 15 wurde die TreA-Aktivität des Stammes GNB 45 (*gbsA-treA*) in Abhängigkeit der Cholinkonzentration aufgetragen.

Wie dieses Experiment zeigt, reicht schon die Zugabe von einer geringen Konzentration (25 µM) an Cholin zum niederosmolaren Wachstumsmedium aus, um die *gbsAB*-Expression zu induzieren. Es konnte auch gezeigt werden, dass eine Cholinkonzentration von 125-150 µM genügt, um eine maximale Expression des *gbsAB*-Operons unter niederosmolaren

Wachstumsbedingungen zu erreichen. Eine Steigerung der Cholinkonzentration hat keine weitere Erhöhung der TreA-Aktivität zur Folge.

#### 1.1.2.4 GbsR vermittelt die Cholininduktion des *gbsAB*-Operons

Aus Experimenten von J. Boch (1996) und G. Nau-Wagner (1999) war bekannt, dass eine Unterbrechung des offenen Leserahmens (*orf-2*) bzw. die Ausschaltung des Gens *gbsR*, welches stromaufwärts von den *gbsAB*-Genen liegt, eine verstärkte Glycin Betain Synthese zur Folge hat (Boch, 1996; Nau-Wagner, 1999). Um dies weiter zu untersuchen, wurden TreA-Tests mit den *Bacillus subtilis* Stämmen GNB45 (*gbsR*<sup>+</sup>) und GNB48 (*gbsR*<sup>-</sup>), die beide die gleiche *gbsA-treA*-Fusion enthielten, durchgeführt. Beide Stämme wurden bei 37°C und 220 rpm in SMM-Medium bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,25 wachsen gelassen, dann erfolgte jeweils die Zugabe von 0,4 M NaCl, 1 mM Cholin oder 0,4 M NaCl und 1 mM Cholin. 90 Minuten nach der Zugabe wurden Proben genommen und die TreA-Aktivität bestimmt (Abb. 17).

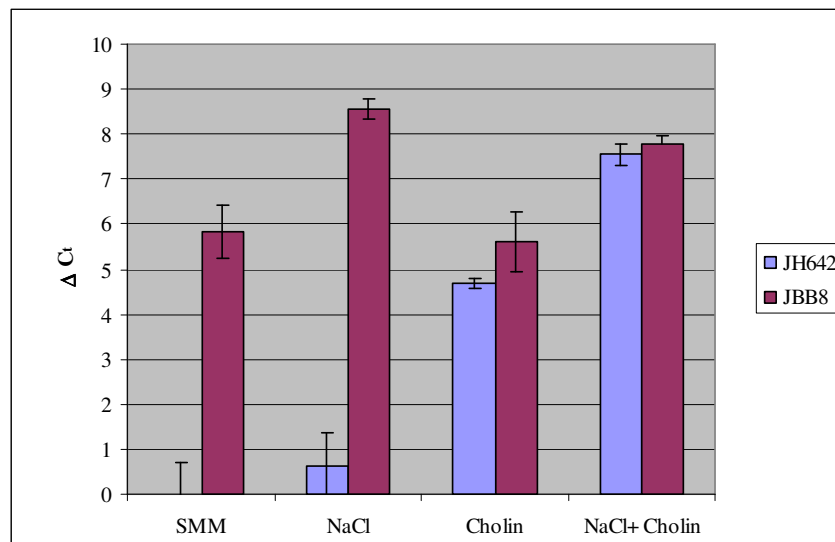


**Abbildung 17: Expression des *gbsA*-Gens unter verschiedenen Bedingungen.**

Es wurde die TreA-Aktivität der *B.subtilis* Stämme GNB45 (*gbsA-treA*) (■) und GNB48 (*gbsR::neo, gbsA-treA*) (■) 90 Minuten nach Zugabe von 0,4 M NaCl, 1 mM Cholin und 0,4 M NaCl und 1 mM Cholin bestimmt.

In Abbildung 17 ist zu sehen, dass der Stamm GNB45 (*gbsR*<sup>+</sup>) dem gleichen Muster aus Abb. 14 folgt. Durch das Ausschalten des *gbsR*-Gens im Stamm GNB48 zeigt sich eine Derepression der *gbsA*-Expression. Dieser Stamm antwortet weder auf Cholin noch auf erhöhte Osmolarität. Das *gbsAB*-Operon wird unter diesen Bedingungen konstitutiv exprimiert.

Zur weiteren Bestätigung wurden Real Time PCR Analysen durchgeführt. Dazu wurden die Stämme JH642 (*gbsR*<sup>+</sup>) und JBB8 (*gbsR*<sup>-</sup>) in SMM bei 37°C angezogen. Analog erfolgte bei einer OD<sub>578</sub> von 0,25 die Zugabe der oben erwähnten Zusätze. Nach 90 Minuten wurden die Zellen geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Nach der Umschreibung in die cDNA erfolgte die Real Time PCR Analyse, mit der jeweiligen cDNA als Template und *gbsA*-spezifischen Primern (RT-*gbsA1* fwd, RT-*gbsA1* rev) (Abb. 18).



**Abbildung 18: Expression des *gbsA*-Gens unter verschiedenen Bedingungen.**

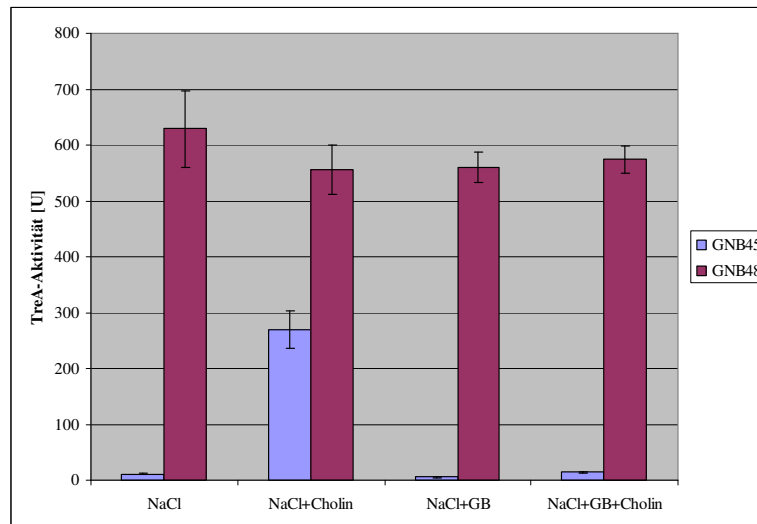
Gezeigt ist die Expression des *gbsA*-Gens im Wildtyp JH642 (■) und der *gbsR*::*neo*-Mutante JBB8 (■) nach der Real Time PCR Analyse.

Die Auswertung der Real Time PCR zeigt dieselben Resultate wie die zuvor durchgeführten TreA-Experimente. Das *gbsAB*-Operon ist im Gegensatz zum Wildtyp-Stamm in der *gbsR*::*neo* Mutante JBB8 ebenfalls konstitutiv exprimiert.

#### 1.1.2.5 Auswirkung von Glycin Betain auf die *gbsAB*-Expression

Die Funktion des Glycin Betain-Syntheseweges besteht darin, das kompatible Solut Glycin Betain aus der Vorstufe Cholin zu synthetisieren (Boch *et al.*, 1996). Aus diesem Grund ist es verständlich, dass die Expression der *gbsAB*-Gene, wie in 1.1.2.1 gezeigt, durch die Vorstufe Cholin induziert wird. Im Folgenden soll nun untersucht werden, ob das Endprodukt des Glycin Betain Syntheseweges, Glycin Betain, einen Einfluss auf die *gbsAB*-Expression ausübt. Ein reprimierender Effekt von Glycin Betain wurde für die Regulation des *bet*-Regulons in *E. coli* beschrieben (Eshoo, 1988). Dazu wurden die Stämme GNB45 (*gbsR*<sup>+</sup>) und GNB48 (*gbsR*::*neo*) bei 37°C und 220 rpm in SMM-Medium mit 0,4 M NaCl, in SMM-Medium mit 0,4 M NaCl plus 1 mM Cholin, in SMM-Medium mit 0,4 M NaCl plus 1 mM

Glycin Betain und in SMM- Medium mit NaCl plus 1 mM Cholin und 1 mM Glycin Betain bis zu einer OD<sub>578</sub> von 1,5 gezogen. Anschließend wurden Proben entnommen und die TreA-Aktivität der Kulturen bestimmt (Abb. 19). Die anderen Bedingungen für dieses Experiment ergeben sich daraus, dass den Zellen Zeit gegeben wird Glycin Betain zu synthetisieren.



**Abbildung 19: Auswirkung von Cholin und Glycin Betain auf die *gbsAB*-Expression.**

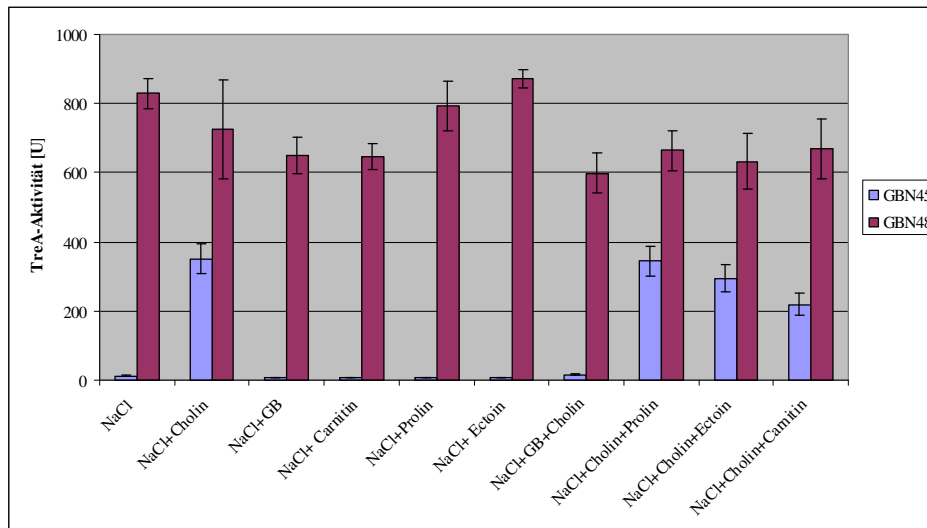
Dargestellt sind die TreA-Aktivitäten der unterschiedlichen Kulturen der Stämme GNB45 (■) und GNB48 (■).

Aus Abbildung 19 lässt sich erkennen, dass das Endprodukt Glycin Betain im Stamm GNB45 die *gbsAB*-Expression in Anwesenheit von Cholin deutlich reprimiert. Auch ist in diesem Experiment eindeutig zu sehen, dass dieser reprimierende Effekt von Glycin Betain abhängig von GbsR ist, denn im Stamm GNB48 (*gbsR::neo*) ist dieser Effekt nicht zu sehen. Ist das *gbsR*-Gen ausgeschaltet, so kann Glycin Betain die Expression des *gbsAB*-Operons nicht mehr reprimieren. Um eindeutig sagen zu können, dass dieser Effekt allein auf Glycin Betain beruht, und nicht ein Phänomen der osmotischen Schutzsubstanzen ist, wurden in einem weiteren Versuch mehrere kompatible Solute auf diesen Effekt getestet.

#### 1.1.2.6 Auswirkung von anderen kompatiblen Soluten auf die *gbsAB*-Expression

Um herauszufinden, ob der reprimierende Effekt allein auf Glycin Betain beruht wurden die Stämme GNB45 (*gbsR*<sup>+</sup>) und GNB48 (*gbsR::neo*) unter denselben Bedingungen wie in 1.1.2.5 beschrieben, gezogen. Zusätzlich wurden die kompatiblen Solute Carnitin, Prolin und Ectoin, sowie deren Kombination mit Cholin dem Wachstumsmedium zugesetzt. Nach dem Erreichen der mittleren logarithmischen Phase (OD<sub>578</sub> von 1,5), erfolgte die Probennahme und die Bestimmung der TreA-Aktivität (Abb. 20)





**Abbildung 20: Auswirkung von kompatiblen Soluten auf die *gbsAB*-Expression.**

Dargestellt sind die TreA-Aktivitäten der unterschiedlichen Kulturen der Stämme GNB45 (■) und GNB48 (■)

Abbildung 20 zeigt zum einen, dass in GNB45 (*gbsR*<sup>+</sup>) weder Prolin noch Ectoin oder Carnitin in der Lage sind das System zu induzieren. Zum anderen wird deutlich, dass keine dieser osmotischen Schutzsubstanzen fähig ist, die *gbsAB*-Expression im gleichen Maße wie Glycin Betain zu reprimieren. Möglicherweise ist ein minimaler Effekt von Carnitin sichtbar. Dies könnte damit zusammenhängen, dass Carnitin eine ähnliche Struktur wie Glycin Betain besitzt. Auch ist in diesem Experiment wiederholt gezeigt worden, dass die Repression der *gbsAB*-Expression von GbsR abhängig ist, denn im Stamm GNB48 (*gbsR::neo*) ist das Operon konstitutiv exprimiert. Aus all diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass der reprimierende Effekt ein Glycin-Betain-spezifischer Effekt ist. Das Endprodukt des Cholin zu Glycin Betain Synthesewegs reprimiert also die *gbsAB*-Expression.

#### 1.1.2.7 Unterbindung der Metabolisierung des Induktors Cholin

Die bisherigen aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass Cholin, die Expression des *gbsAB*-Operons induziert und das Endprodukt Glycin Betain die Expression der *gbsAB*-Gene reprimiert. Der Induktor Cholin wird durch die Oxidation von Cholin zu Glycin Betain ständig aus der Zelle entfernt. Wird die Metabolisierung von Cholin unterbunden, so sollte eine Steigerung der Expression des *gbsAB*-Operons erreicht werden, da sich dann Cholin in der Zelle anreichern sollte. Durch die Zugabe von Glycin Betain sollte die *gbsAB*-Expression aber wieder reprimiert werden können.

Der Stamm GNB46, der Cholin aufgrund einer Deletion der *gbsAB*-Gene, nicht mehr zu dem kompatiblen Solut Glycin Betain umsetzen kann, wurde mit den Stämmen GNB45 und

GNB48 im Minimalmedium ohne Cholin, sowie mit 1 mM Cholin oder mit 1 mM Cholin und 1 mM Glycin Betain über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Kulturen in Medium mit gleicher Zusammensetzung überimpft. Nach Erreichen der mittleren logarithmischen Phase (OD<sub>578</sub> von 1,5) wurde die TreA-Aktivität der Kulturen bestimmt (Tab. 16). In diesem Versuch wurde auf die Zugabe von 0,4 M NaCl verzichtet, da ein  $\Delta gbsAB$ -Stamm durch die Zugabe von Cholin zum Wachstumsmedium schon im Wachstum inhibiert ist (Boch *et al.*, 1996) und nicht noch zusätzlich durch hohe Osmolarität gestresst werden sollte.

**Tabelle 16: Bedingungen, unter denen eine Steigerung der Expression des *gbsAB*-Operons erreicht wird.** Die Stämme GNB45, GNB46 und GNB48 wurden über Nacht in SMM-Medium ohne Cholin, sowie mit 1 mM Cholin oder 1 mM Cholin + 1 mM Glycin Betain inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Überimpfung der Kulturen in Medium mit gleicher Zusammensetzung und nach Erreichen der OD von 1,5 wurde die TreA-Aktivität gemessen.

Stamm	relevanter Genotyp	Zusatz zum Wachstumsmedium	TreA-Aktivität (U)
GNB45	<i>gbsAB</i> <sup>+</sup> <i>gbsR</i> <sup>+</sup>	-	6 +/- 0,3
	<i>gbsAB</i> <sup>+</sup> <i>gbsR</i> <sup>+</sup>	1 mM Cholin	106 +/- 3
	<i>gbsAB</i> <sup>+</sup> <i>gbsR</i> <sup>+</sup>	1 mM Cholin+ 1 mM GB	5 +/- 0,3
GNB46	<i>gbsAB</i> <sup>-</sup> <i>gbsR</i> <sup>+</sup>	-	6 +/- 0,3
	<i>gbsAB</i> <sup>-</sup> <i>gbsR</i> <sup>+</sup>	1 mM Cholin	534 +/- 7
	<i>gbsAB</i> <sup>-</sup> <i>gbsR</i> <sup>+</sup>	1 mM Cholin+ 1 mM GB	5 +/- 0,1
GNB48	<i>gbsAB</i> <sup>+</sup> <i>gbsR</i> <sup>-</sup>	-	478 +/- 16
	<i>gbsAB</i> <sup>+</sup> <i>gbsR</i> <sup>-</sup>	1 mM Cholin	468 +/- 19
	<i>gbsAB</i> <sup>+</sup> <i>gbsR</i> <sup>-</sup>	1 mM Cholin+ 1 mM GB	515 +/- 27

Der Stamm GNB45 zeigt eine TreA-Aktivität von 106 U, d.h. Cholin induziert wie zuvor beschrieben die *gbsAB*-Expression. In dem  $\Delta gbsAB$ -Stamm GNB46 wird der Induktor Cholin angereichert. Es konnte eine fast 5-fach höhere TreA-Aktivität, als im Vergleichsstamm GNB45, welcher in der Lage ist Cholin zu Glycin Betain zu oxidieren und somit Cholin ständig aus der Zelle zu entfernen, bestimmt werden. Das heißt, auch dieser Stamm ist im Vergleich zu GNB48 (*gbsR::neo*) noch durch Cholin induzierbar. Setzt man GNB46 Glycin Betain im Wachstumsmedium zu, so ist dieser ebenfalls wie der Wildtyp-Stamm GNB45 in der Lage die *gbsAB*-Expression herunterzufahren.

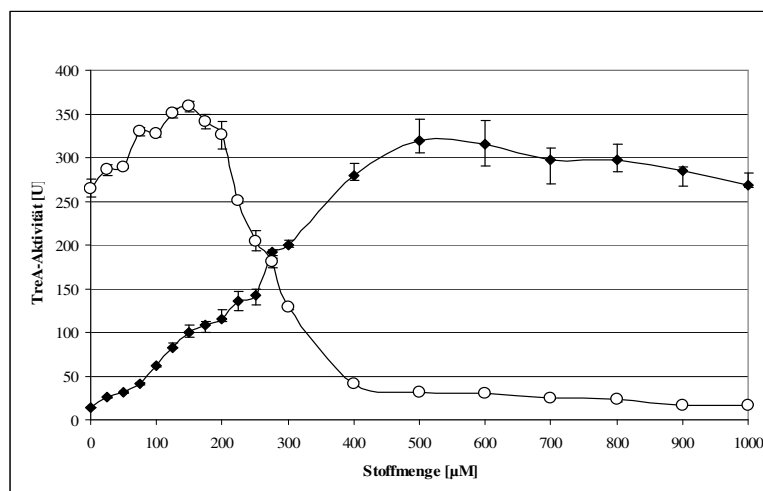
#### 1.1.2.8 GbsR vermittelt die Repression des *gbsAB*-Operons durch Glycin Betain

Wie in 1.1.2.4 gezeigt, vermittelt GbsR die Induktion des *gbsAB*-Operons durch Cholin. Offen ist nun die Frage, ob *gbsR* auch bei der Repression des *gbsAB*-Operons durch Glycin

Betain beteiligt ist. Aus Abbildung 19 (1.1.2.5) und Abbildung 20 (1.1.2.6) geht hervor, dass im *gbsR*-Stamm GNB48 das *gbsAB*-Operon konstitutiv exprimiert ist, und weder eine Zugabe von Cholin noch eine Zugabe von Glycin Betain zum Wachstumsmedium einen Einfluss auf die *gbsAB*-Expression hat. Auch Tabelle 16 (1.1.2.7) zeigt, dass Glycin Betain im Stamm GNB48 keinen reprimierenden Effekt auf das *gbsAB*-Operon hat. Auch hier ist das *gbsAB*-Operon mit Cholin und Glycin Betain im Wachstumsmedium angeschaltet (TreA-Aktivität von 478 U). Somit hat das Ausschalten des *gbsR*-Gens nicht nur die Aufhebung der Cholininduktion zur Folge, sondern auch die Aufhebung der Glycin Betain-Repression. Da das *gbsAB*-Operon auch unter diesen Bedingungen konstitutiv exprimiert ist, ist eindeutig, dass GbsR auch die Repression des *gbsAB*-Operons durch Glycin Betain vermittelt, wenn der Induktor Cholin vorhanden ist.

#### 1.1.2.9 Einfluss der Cholin- und Glycin Betain-Menge auf die *gbsAB*-Expression während des Wachstums

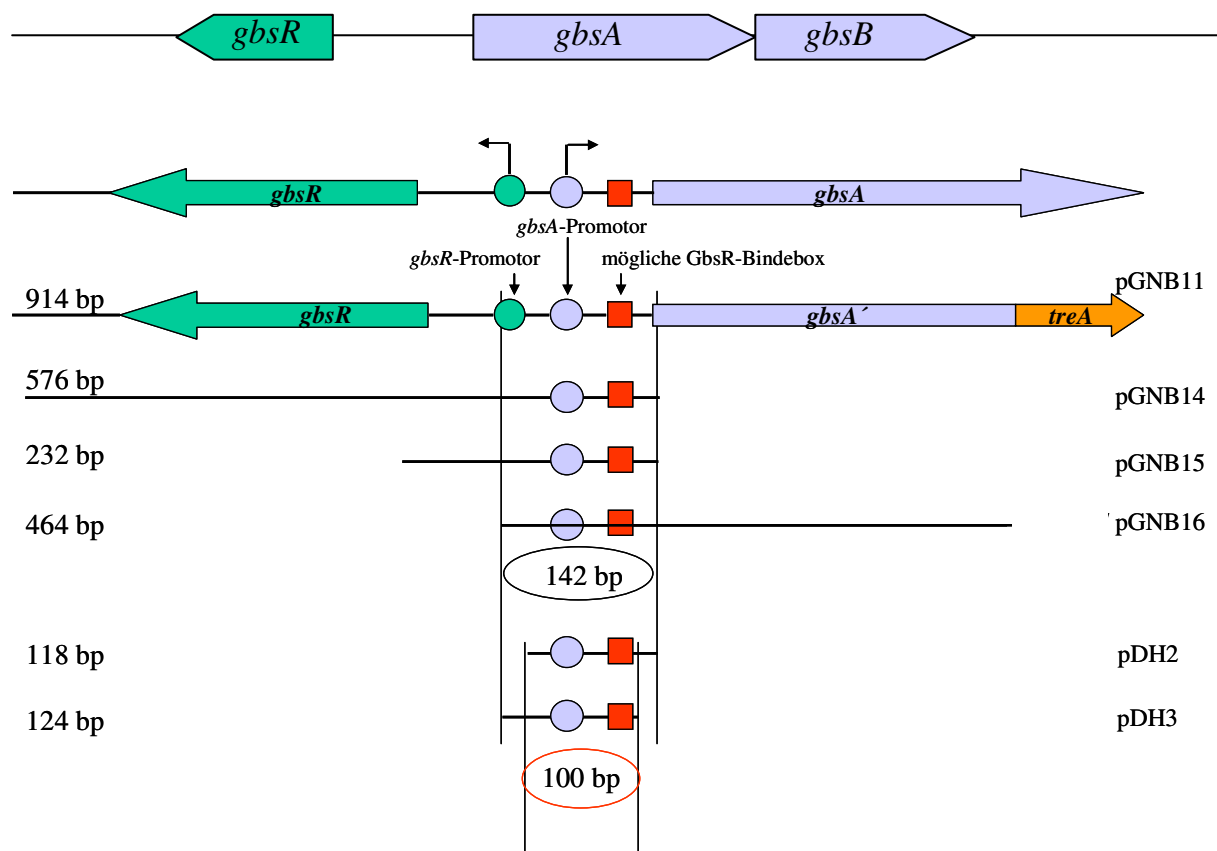
Um zu sehen, wie die *gbsAB*-Expression bei unterschiedlichen Mengen von Cholin und Glycin Betain aussieht, wurde der Stamm GNB45 in SMM-Medium mit 0,4 M NaCl und 0 bis 1 mM Cholin, sowie in SMM-Medium mit 0,4 M NaCl, 1 mM Cholin und 0 bis 1 mM Glycin Betain bei 37°C und 220 rpm gezogen. Nach Erreichen der mittleren logarithmischen Phase ( $OD_{578}$  von 1,5) wurden Proben entnommen und die TreA-Aktivität bestimmt (Abb. 21).



**Abbildung 21:** *gbsAB*-Expression bei unterschiedlichen Mengen Cholin und Glycin Betain im Wachstumsmedium. Dargestellt sind die TreA-Aktivitäten des Stammes GNB45 bei ansteigenden Mengen von Cholin (♦) und Glycin Betain + Cholin (○).

Aus dieser Abbildung geht hervor, dass mit zunehmender Cholinmenge die Expression des *gbsAB*-Operons steigt. Ab einem Wert von ca. 400  $\mu\text{M}$  Cholin ist keine große Steigerung der *gbsAB*-Expression mehr möglich. Betrachtet man hingegen die Kurve mit 1 mM Cholin und ansteigenden Mengen an Glycin Betain, so kann man sagen, dass bei geringen Mengen an Glycin Betain (0-200  $\mu\text{M}$ ) noch keine Repression der *gbsA*-Expression stattfindet. 400  $\mu\text{M}$  Glycin Betain sind ausreichend um eine deutliche Repression des *gbsAB*-Operons zu erzielen. Somit ist gezeigt, dass es sich hier um eine sehr feine Abstimmung der *gbsAB*-Expression handelt.

### 1.1.2.10 Ermittlung des minimalen für die Regulation des *gbsAB*-Operons wichtigen DNA-Abschnitts



**Abbildung 22:** Übersicht der bereits vorhandenen und neu konstruierten *gbsA'*-*treA*-Fusionen zur Untersuchung der Regulation der *gbsAB*-Expression in *B. subtilis*. Dargestellt sind die *gbs*-Gene und die daraus abgeleiteten Plasmide, die verschiedene *gbsA'*-*treA*-Fusionen tragen. Rot eingezeichnet ist die mögliche Bindebox von GbsR (näheres unter Kapitel IV.4).

Aus der vorangegangenen Arbeit von Gabriele Nau-Wagner (1999), die die Stämme GNB52, GNB53 und GNB54 konstruierte, geht hervor, dass ein 142 bp großes Fragment der *gbsA*-Promotorregion ausreicht (Stamm GNB53), um die vollständige Repression des *gbsAB*-Operons unter nicht induzierenden Bedingungen zu gewährleisten (Nau-Wagner, 1999). Zur weiteren Ermittlung des minimalen DNA-Abschnittes, welcher für die vollständige Regulation des *gbsAB*-Operons nötig ist, wurden zwei zusätzliche *gbsA'*-*treA*-Fusionen konstruiert (pDH2, pDH3). Diese Fusionen unterscheiden sich nur in der Länge der *gbsA*-Promotorregion voneinander. Die beiden Plasmide pDH2 und pDH3 wurden sowohl bei dem *B. subtilis* Wildtypstamm (GNB37) als auch bei der *B. subtilis* *gbsR::neo*-Mutante (GNB40) in das Genom integriert. Die daraus abgeleiteten Stämme DHB4 und DHB5 (Wildtyp-Hintergrund) bzw. DHB12 und DHB13 (*gbsR::neo*-Hintergrund) wurden zusammen mit den anderen Stämmen von G. Nau-Wagner in Minimalmedium bei 37°C und 220 rpm bis zum

Erreichen einer OD<sub>578</sub> von 0,25 inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt wurden Proben entnommen und dem TreA-Test unterzogen. Anschließend wurden die Kulturen mit 0,4 M NaCl und 1 mM Cholin versetzt und weiter inkubiert. Nach 90 Minuten wurden wieder Proben genommen und die TreA-Aktivität bestimmt. In Tabelle 17 sind die TreA-Aktivitäten der unterschiedlichen Kulturen zusammengefasst.

**Tabelle 17: Identifizierung des minimalen, für die Regulation von *gbsAB* durch GbsR nötigen DNA-Abschnitts. Angegeben sind die TreA-Aktivitäten nach 90 minütiger Induktion mit 1 mM Cholin und 0,4 M NaCl.**

Stamm	Plasmid	relevanter Genotyp	TreA-Aktivität uninduziert [U]	TreA-Aktivität induziert [U]
GNB45	pGNB11	<i>gbsR</i> <sup>+</sup>	3 +/- 0,5	247 +/- 24
GNB48	pGNB11	<i>gbsR</i> <sup>-</sup>	454 +/- 24	420 +/- 21
GNB52	pGNB14	<i>gbsR</i> <sup>+</sup>	4 +/- 0,4	175 +/- 3
GNB63	pGNB14	<i>gbsR</i> <sup>-</sup>	399 +/- 25	280 +/- 15
GNB53	pGNB15	<i>gbsR</i> <sup>+</sup>	5 +/- 0,2	186 +/- 8
GNB64	pGNB15	<i>gbsR</i> <sup>-</sup>	312 +/- 10	304 +/- 5
GNB54	pGNB16	<i>gbsR</i> <sup>+</sup>	6 +/- 0,7	722 +/- 39
GNB65	pGNB16	<i>gbsR</i> <sup>-</sup>	1295 +/- 85	1129 +/- 120
DHB4	pDH2	<i>gbsR</i> <sup>+</sup>	5 +/- 0,5	174 +/- 22
DHB12	pDH2	<i>gbsR</i> <sup>-</sup>	362 +/- 16	331 +/- 23
DHB5	pDH3	<i>gbsR</i> <sup>+</sup>	5 +/- 0,9	150 +/- 9
DHB13	pDH3	<i>gbsR</i> <sup>-</sup>	216 +/- 12	216 +/- 12

Wie aus Tabelle 17 zu entnehmen ist, unterscheiden sich die TreA-Aktivitäten der nicht induzierten Kulturen von GNB52, GNB53, GNB54, DHB4 und DHB5 nicht von der TreA-Aktivität des Kontrollstammes GNB45, der die längste *gbsA*'-treA-Fusion trägt. Weiterhin zeigt Tabelle 17, dass alle verkürzten Fusionen noch der Cholininduktion unterliegen und die *gbsA*'-treA-Expression in einer *gbsR::neo*-Mutante dereprimiert wird. Sie erreichen jedoch unterschiedliche Endaktivitäten, einige sind etwas niedriger und eine ist sehr viel höher (GNB54 bzw. GNB65). Betrachtet man nun die verkürzten *gbsA*'-treA-Fusionen in einem *gbsR::neo*-Stammbhintergrund, so erhält man eine konstitutive Expression des *gbsAB*-Operons. Die hier aufgeführten Daten zeigen, dass sich das minimale für die Regulation wichtige Fragment von 142 bp (Nau-Wagner, 1999) auf ein 100 bp großes Fragment der *gbsA*-Promotorregion reduzieren lässt, abgeleitet aus den 118 bzw. 124 bp (siehe Abb. 22).

Diese 100 bp reichen aus, um eine Induktion des *gbsAB*-Operons durch Cholin und seine Derepression in einer *gbsR::neo*- Mutante zu gewährleisten.

## 2. Experimentelle Charakterisierung von GbsR

### 2.1 Konstruktion eines Expressionsplasmides zur heterologen Überproduktion von GbsR aus *B. subtilis* in *E. coli*

Aus den bisherigen Daten zur Regulation des *gbsAB*-Operons geht hervor, dass dieses durch das Vorhandensein von Cholin induziert wird und anschließend durch die Präsenz des Endproduktes Glycin Betain reprimiert wird. Beide Effekte werden anhand der zuvor gezeigten Daten durch GbsR vermittelt. Demnach codiert das *gbsR*-Gen für ein Repressorprotein, dessen Ausschaltung eine konstitutive Expression des *gbsAB*-Operons bewirkt. Der minimale, für die Regulation wichtige DNA-Abschnitt konnte auf 100 bp eingegrenzt werden. Es liegt somit die Vermutung nahe, dass sich auf diesem DNA-Abschnitt die mögliche Binderegion für das GbsR Protein befindet. Um dies näher zu betrachten, sollten weitere Versuche mit dem gereinigten GbsR Protein unternommen werden. Auch die Frage, ob GbsR Cholin bindet, da es als Cholinsensor fungiert, konnte nur beantwortet werden, indem das reine GbsR-Protein zur Verfügung stand. Das heißt, um dieses Protein näher zu charakterisieren, musste das GbsR-Protein überexprimiert und gereinigt werden. Ausgangspunkt für die Konstruktion eines Expressionsplasmides für die heterologe Überproduktion von GbsR war das Plasmid pASK-IBA7 (IBA, Göttingen, D). Das *gbsR*-Gen wurde mittels PCR mit den in Tabelle 4 genannten Primern (GbsR *BsaI* fwd und GbsR *BsaI* rev) aus chromosomaler DNA des *B. subtilis* Wildtypstammes JH642 amplifiziert und mit dem Restriktionsenzym *BsaI* geschnitten, so dass das entstandene PCR-Produkt Überhänge erhielt, die komplementär zu denen des zuvor ebenfalls mit *BsaI* linearisierten pASK-IBA7-Vektors waren. Daraus resultierte der Überexpressionsvektor pDH1 (siehe Abb. 6).

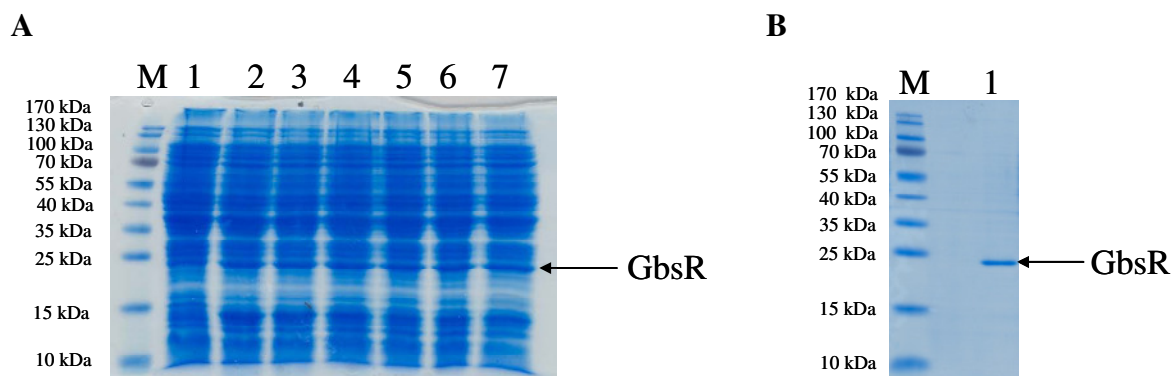
In diesem Vektor liegt *gbsR* unter der Kontrolle eines mit Anhydrotetracyclin induzierbaren *tet*-Promotors vor. Weiterhin ist der Expressionsvektor so konzeptioniert, dass das resultierende GbsR-Protein N-terminal einen *Strep*-tagII<sup>®</sup> trägt, über den das Protein mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden kann. Dieser Tag ist mit dem GbsR über einen vier Aminosäuren-Linker verknüpft, der eine Erkennungsstelle für die Protease FactorXa darstellt. Somit kann das produzierte GbsR-Protein von dem N-terminal anfusionierten *Strep*-

tagII<sup>®</sup> abgeschnitten werden. Für die Überexpression von *gbsR* wurde das Plasmid pDH1 in den *E. coli* Stamm BL21 transformiert. Der entstandene Stamm BL21 (pDH1) wurde zur Produktion des GbsR-Proteins genutzt.

## 2.2 Überexpression und Reinigung des GbsR-Proteins

Um das GbsR-Protein hinsichtlich seiner DNA-Bindung und Cholinbindung näher untersuchen zu können, wurde das GbsR-Protein heterolog in *E. coli* überproduziert und mittels FPLC-Chromatographie gereinigt.

Die Überproduktion des GbsR-Proteins erfolgte in 6 x 1l Minimalmedium A (Sambrook *et al.*, 1989) mit Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml), welches mit einer Übernachtskultur *E. coli* BL21 (pDH1) auf eine OD<sub>578</sub> von 0,1 angeimpft wurde. Die Kulturen wurden bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,5 - 0,7 inkubiert. An diesem Punkt erfolgte die Zugabe von Anhydrotetracyclin (Endkonzentration: 200µg/l), welches die Transkription des *gbsR*-Gens induziert. Sowohl vor der Induktion als auch kurz vor der Ernte der Zellen wurden 1 ml Kultur aus dem Kulturkolben entnommen, abzentrifugiert und das Zellpellet eingefroren. Mittels SDS-PAGE (Abb. 23 A) konnte nun anhand dieser Proben überprüft werden, ob das GbsR-Protein erfolgreich in den *E. coli* Zellen überproduziert wurde.



**Abbildung 23: SDS-PAGE der heterologen Überexpression und Reinigung des GbsR Proteins aus *B. subtilis* in *E. coli*.** Die Abbildung (A) zeigt ein SDS-PAGE des Ganzellektrates der Zellen aus der Überproduktion vor (1) und nach Induktion (2-7) der Expression des *gbsR*-Gens. Die Spuren 2-7 zeigen jeweils eine Probe aus den sechs Kulturen (B) Das 21 kDa-Protein GbsR konnte zu einer apparenten Homogenität gereinigt werden. In Spur 1 sind 1,5 µg des gereinigten GbsR-Proteins aufgetragen.

Die Ernte der Zellen erfolgte eineinhalb bis zwei Stunden nach der Induktion des *gbsR*-Gens durch die Zugabe von Anhydrotetracyclin. Die geernteten Zellen wurden anschließend in einem Aufschlusspuffer (100mM Tris\*HCl pH 7,5, 2,5 % Glycerin, 2 mM DTT, 0,4 mM



EDTA, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM Benzamidine) resuspendiert und mittels „French Press“ aufgeschlossen. Nach der Zentrifugation der lysierten Zellen in der Ultrazentrifuge (1 h, 4°C und 35000 rpm) erfolgte die Reinigung mittels einer mit 100 ml 100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5 equilibrierten StrepTactin-Säule (IBA, Göttingen, D) (Säulenvolumen: 10 ml) (Voss & Skerra, 1997). Die erhaltenen Fraktionen wurden vereinigt, auf das Vorhandensein und die Reinheit des gereinigten GbsR-Proteins geprüft (Abb. 23 B) und anschließend über Nacht gegen 5 l 10 mM Tris-HCl, pH 7,0 dialysiert. Zum Schluss wurde das GbsR-Protein über Membranen mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa (Vivaspin-columns, VivaScience Ltd., Stonehouse, UK) ankonzentriert. Mit dem so gereinigten GbsR-Protein wurden die DNA- und Cholinbindestudien durchgeführt.

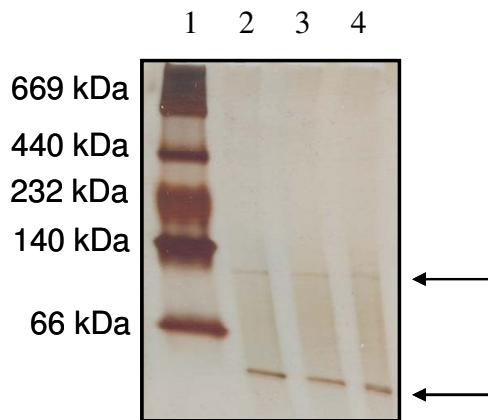
### **2.3 Versuch der Größenbestimmung von GbsR unter nativen Bedingungen**

Das gereinigte GbsR-Protein, sollte biochemisch näher charakterisiert werden. Ein wichtiger Punkt der Charakterisierung ist die Größenbestimmung von GbsR unter nativen Bedingungen. Um die relative molekulare Masse von GbsR über die Gel-Filtrationschromatographie zu bestimmen, wurde eine HiLoad Superdex75 (16/60) Säule verwendet. Dazu wurde ein Aliquot des gereinigten GbsR-Proteins auf die Säule aufgetragen, welche vorher mit 100 mM Tris\*HCl, 150 mM NaCl (pH 7,5) Puffer equilibriert wurde.

Zum Eichen der Säule wurden folgende Markerproteine nach Vorschrift von SIGMA (Gel Filtration Molecular Weight Markers) verwendet: Cytochrom C (12,5 kDa), Carbonsäure Anhydrase (29 kDa), Rinderserum Albumin (66 kDa) und Alkohol Dehydrogenase (150 kDa). Bisher konnten keine eindeutigen Aussagen über die Größe von GbsR gemacht werden, da das Protein fast immer auf der Säule aggregierte und als Aggregat ausgewaschen wurde. Auch ein Wechsel zu anderen Säulen und der Wechsel zu anderen Puffern brachten keinen Erfolg.

Um eine Vorstellung über die relative molare Masse zu bekommen, wurden parallel Protein-Gelelektrophoresen unter nativen Bedingungen durchgeführt. Benutzt wurden Ready-Gels (4-20% Tris\*HCl) von BioRad. Die Proteinproben wurden mit einem Probenpuffer (25 mM Tris/HCl pH 8,3; 192 mM Glycin 17,4% (w/v) Glycerin) auf eine Konzentration von ca. 1 µg eingestellt. Pro Spur wurden 10-20 µl aufgetragen. Als Elektrodenpuffer diente Tris/HCl-Puffer (25 mM Tris/HCl pH 8,3 und 192 mM Glycin). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Stromstärke von 5-10 mA für ca. 16 Stunden. Als Standard zur Bestimmung der Molekulargewichte der getrennten Protein wurde der „HMW-Native Protein Marker“ (GE

Healthcare) verwendet (66-669 kDa). Die Banden wurden anschließend mit der Silberfärbemethode nach Blum *et al.* (1987) detektiert (Abb. 24).



**Abbildung 24: Größenbestimmung von GbsR mittels Nativ-Gelelektrophorese.**  
In Spur 1 sind 5 µl des Protein Markers aufgetragen. Spur 2-4 beinhaltet jeweils 1 µg GbsR.

Abbildung 24 lässt vermuten, dass es sich bei der relativen molaren Masse von GbsR um ein Dimer mit ca. 44 kDa handelt, es könnte aber auch ein Tetramer vermutet werden, da auch bei ca. 88 kDa eine schwache Bande zu sehen ist. Dieses Ergebnis ist somit nicht eindeutig. Aufgrund der Aggregation von GbsR gelang es in allen Wiederholungsversuchen nicht dieses Ergebnis zu reproduzieren.

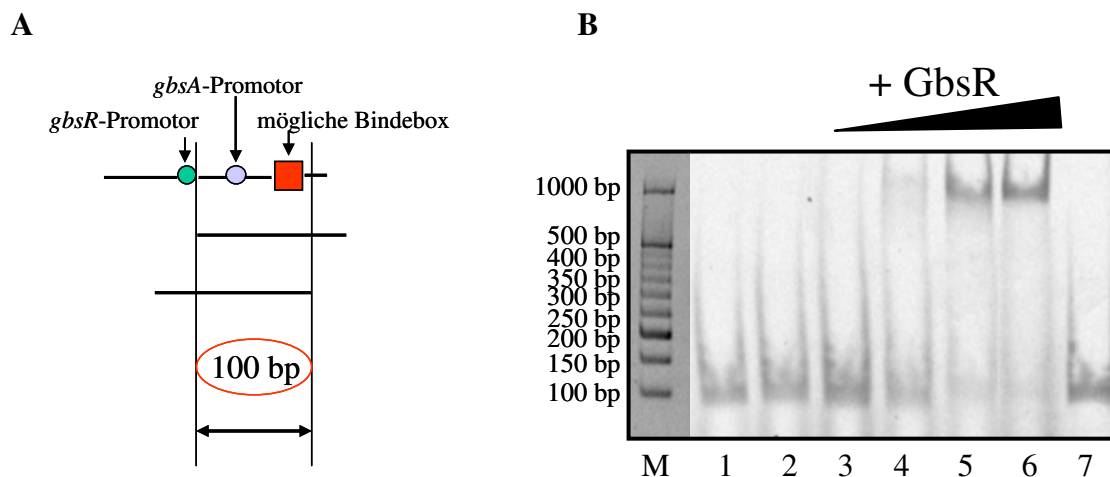
## 2.4 GbsR ist ein DNA-bindendes Protein

### 2.4.1 GbsR bindet an das identifizierte, für die Regulation wichtige *gbsAB*-Fragment

In 1.1.2.10 konnte durch gezielte Verkürzungen der *gbsAB*-Promotorregion ein 100 bp großes Fragment ermittelt werden, welches noch für die Regulation des *gbsAB*-Operons ausreicht. Es liegt somit die Vermutung nahe, dass sich auf diesem Fragment die mögliche Bindestelle für GbsR befindet. Um die Hypothese zu untersuchen, dass das Regulatorprotein GbsR wirklich DNA bindet, wurde ein sogenannter „Electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) durchgeführt. Dieser Test beruht darauf, dass GbsR an das 100 bp große DNA-Fragment bindet und somit seine elektrophoretischen Eigenschaften verändert. Zunächst wurde dieses 100 bp große Fragment mittels PCR amplifiziert. Als Template diente chromosomale *B. subtilis* DNA des Stammes JH642. Um später die DNA detektieren zu können, wurden Primer, welche mit dem fluoreszierenden Farbstoff Cy5 markiert sind, für die PCR eingesetzt (Cy5gbsR-A5\_s, Cy5gbsR-A6\_as). In den Reaktionsansätzen wurden 250 ng Cy5-markiertes

PCR-Produkt und 250 ng nicht markierte Competitor-DNA mit unterschiedlichen Mengen an gereinigtem GbsR-Protein in einem DNA-Bindepuffer (100mM TrisHCl pH 7,5; 150mM NaCl, 1mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 5% Glycerin, 50 µg/ml BSA; Filée *et al.*, 2001) für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf ein TAE-Polyacrylamidgel aufgetragen (8% Acrylamid) und in 1 x TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt (70 V). Das Gel wurde dann auf einem Phosphorimager (Storm 860, Amersham Biosciences) gescannt (Red Fluorescence). Die DNA-Markerbande wurde vor dem Scannen vom Gel abgeschnitten und die DNA in einem Ethidiumbromidbad sichtbar gemacht (Abb. 25 B)

Als Negativkontrollen dienten zum einen ein Reaktionsansatz ohne das GbsR Protein (Abb. 25 B, Spur 3), ein ebenfalls 100 bp großes DNA-Fragment aus einer anderen Region des *B. subtilis* Chromosoms (Abb. 24B, Spur 1), welches anstelle des Fragmentes aus der *gbsAB*-Promotorregion mit GbsR inkubiert wurde (Abb. 25 B, Spur2) und zum anderen ein Reaktionsansatz in dem das 100 bp Fragment aus der *gbsAB*-Promotorregion mit BSA inkubiert wurde (Abb. 25 B, Spur 7).



**Abbildung 25: EMSA des 100 bp *gbsAB* regulatorischen Fragmentes.**

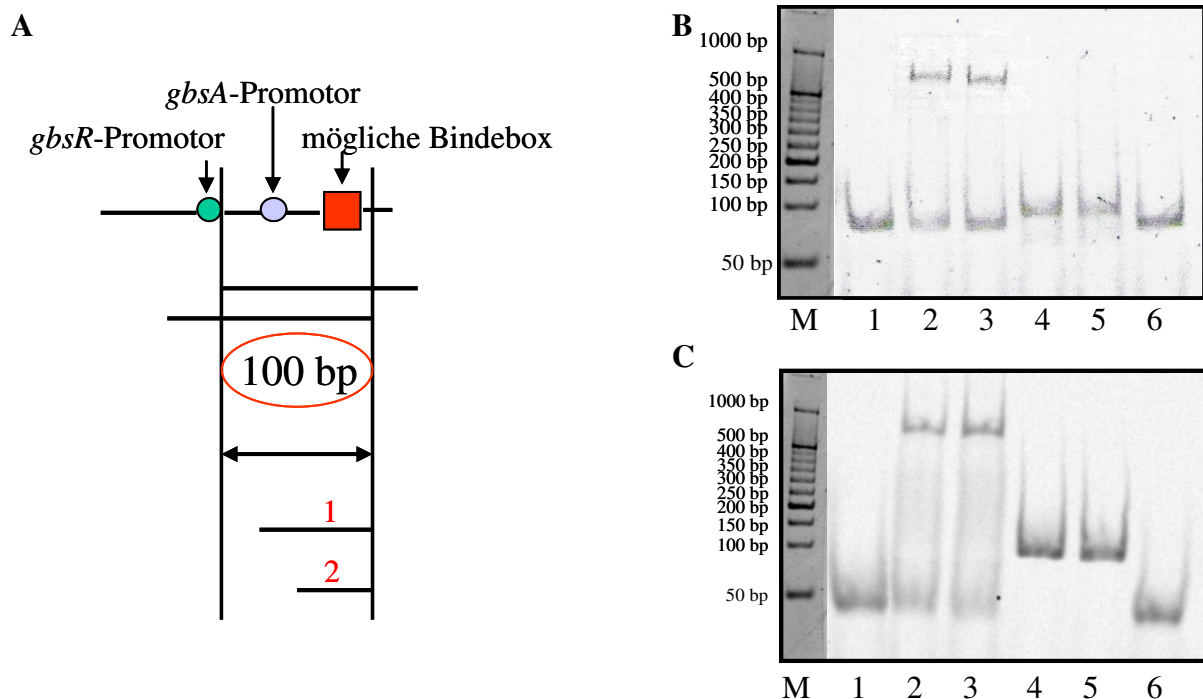
In **A** dargestellt ist das durch systematische Verkürzungen des *gbsAB*-Promotors identifizierte 100 bp große für die Regulation wichtige Fragment, siehe Abb. 22. Dieses Fragment wurde mittels fluoreszenzmarkierter (Cy5) markierter Primer amplifiziert mit GbsR inkubiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt (**B**). Die Laufweite des *gbsAB*-Promotorfragmentes wurde mittels Fluoreszenzdetektion ermittelt. Als Marker wurde der O'RangeRuler™ 50 bp DNA Ladder von Fermentas verwendet. **1:** 250 ng Kontroll-DNA *yitM* (100 bp) aus *B. subtilis* ohne GbsR; **2:** 250 ng Kontroll-DNA *yitM* (100 bp) aus *B. subtilis* inkubiert mit 1 µg GbsR als Negativkontrolle; **3:** 250 ng *gbsAB*-Fragment (100 bp) ohne GbsR; **4:** 250 ng *gbsAB*-Fragment (100 bp) inkubiert mit 40 ng GbsR; **5:** 250 ng *gbsAB*-Fragment (100 bp) inkubiert mit 200 ng GbsR; **6:** 250 ng *gbsAB*-Fragment (100 bp) inkubiert mit 1 µg GbsR; **7:** 250 ng *gbsAB*-Fragment (100 bp) inkubiert mit 1 µg BSA als Negativkontrolle.

Die Analyse des Gels ergab, dass nach der Inkubation mit gereinigtem, reinem GbsR das *gbsAB*-Promotorfragment nicht so weit in Richtung der Anode gewandert war, wie die

Kontrolle des Fragmentes ohne GbsR. Zu sehen ist auch, dass die geschiftete Bande mit Zunahme der Proteinkonzentration stärker wird. Alle anderen Kontrollen hingegen zeigten dieselbe Laufweite wie die Kontrolle ohne GbsR. Diese Beobachtungen besagen zum einen, dass es sich bei dem gereinigten GbsR um ein aktives Protein handelt, welches in der Lage ist DNA zu binden. Und zum anderen ist gezeigt worden, dass GbsR spezifisch die DNA der *gbsAB*-Promotorregion bindet, denn die Kontrollen mit einem anderen DNA-Fragment (*yitM*) zeigen keinen Shift und somit keine Bindung. Auch ist der Shift nicht durch das *gbsAB*-DNA-Fragment verursacht, denn eine Kontrolle mit BSA liefert keine veränderte Laufweite.

### 2.4.2 Eingrenzung der möglichen Bindestelle von GbsR

Um eine mögliche Bindestelle für GbsR zu identifizieren, wurden ausgehend von dem 100 bp Fragment der *gbsAB*-Promotorregion weitere PCR Produkte amplifiziert (Abb. 26 A) und mittels EMSA analysiert. Es wurden ein 75 bp großes Fragment, welches die mögliche Bindebox und den *gbsA*-Promotor enthält (Abb. 26 B), und ein 50 bp großes Fragment, welches nur noch die mögliche Bindebox enthält, (Abb. 26 C) näher untersucht.



**Abbildung 26: EMSA des 75 bp großen und 50 bp großen Fragmentes.**

In (A) dargestellt ist das durch systematische Verkürzungen des *gbsAB*-Promotors identifizierte 100 bp große Fragment (siehe Abb. 22). Dieses Fragment wurde als Basis für weitere Verkürzungen genommen. Die beiden Fragmente 1 (75 bp) und 2 (50 bp) wurden mittels fluoreszenzmarkierter (Cy5) markierter Primer amplifiziert mit GbsR inkubiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt (B). Die Laufweite des *gbsAB*-Promotorfragmentes wurde mittels Fluoreszenzdetektion ermittelt. Als Marker wurde der O'RangeRuler™ 50 bp DNA Ladder von Fermentas verwendet. **1:** 250 ng *gbsAB*-Fragment (75 bp) ohne GbsR; **2:** 250 ng *gbsAB*-Fragment (75 bp) inkubiert mit 100 ng GbsR; **3:** 250 ng *gbsAB*-Fragment (75 bp) inkubiert mit 200 ng GbsR; **4:** 250 ng Kontroll-DNA *yitM* (100 bp) aus *B. subtilis* ohne GbsR; **5:** 250 ng Kontroll-DNA *yitM* (100 bp) aus *B. subtilis* inkubiert

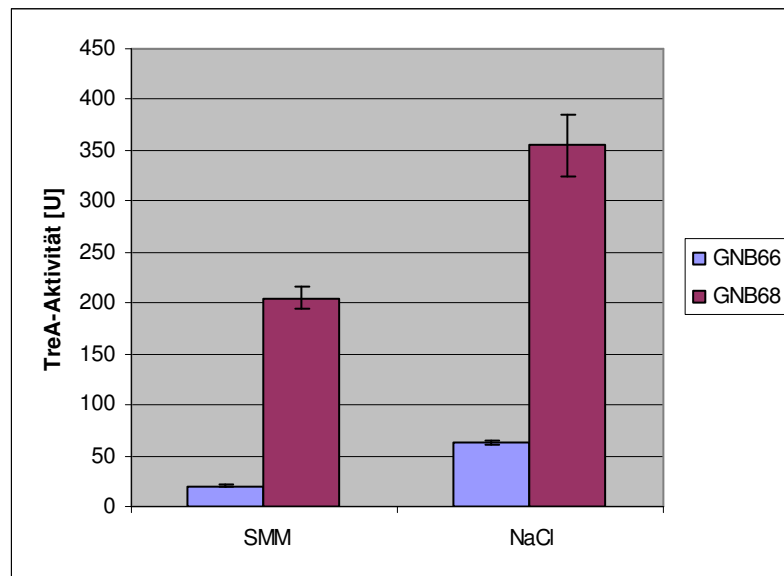
mit 1 µg GbsR als Negativkontrolle; **6**: 250 ng *gbsAB*-Fragment (75 bp) inkubiert mit 1 µg BSA als Negativkontrolle. (C). Die Laufweite des *gbsAB*-Promotorfragmentes wurde mittels Fluoreszenzdetektion ermittelt. Als Marker wurde der O'RangeRuler™ 50 bp DNA Ladder von Fermentas verwendet. **1**: 250 ng *gbsAB*-Fragment (50 bp) ohne GbsR; **2**: 250 ng *gbsAB*-Fragment (50 bp) inkubiert mit 100 ng GbsR; **3**: 250 ng *gbsAB*-Fragment (50 bp) inkubiert mit 200 ng GbsR; **4**: 250 ng Kontroll-DNA *yitM* (100 bp) aus *B. subtilis* ohne GbsR; **5**: 250 ng Kontroll-DNA *yitM* (100 bp) aus *B. subtilis* inkubiert mit 1 µg GbsR als Negativkontrolle; **6**: 250 ng *gbsAB*-Fragment (50 bp) inkubiert mit 1 µg BSA als Negativkontrolle.

Die Auswertung der beiden Gele ergab, dass die beiden *gbsAB*-Promotorfragmente nach der Inkubation mit gereinigtem GbsR einen deutlichen Shift zeigten. Alle anderen Kontrollen hingegen zeigten dieselbe Laufweite wie die Kontrolle ohne GbsR. Somit ist gezeigt worden, dass GbsR immer noch an das 75 bp und das 50 bp Fragment binden kann. Alle bisherigen Daten demonstrieren, dass die mögliche Bindestelle für GbsR auf dem 50 bp großen Fragment liegt, da dieses das bisher kleinste noch shiftende Fragment darstellt.

### **3. Einfluss von GbsR auf OpuB und OpuC**

#### **3.1 GbsR vermittelt die Cholininduktion des OpuB-Aufnahmesystems**

Aus früheren Experimenten von G. Nau-Wagner geht hervor, dass *gbsR* an der Regulation der Cholinaufnahme durch den ABC-Transporter OpuB beteiligt ist (Nau-Wagner, 1999). Weiter konnte mittels Transportdaten gezeigt werden, dass die osmotische Induzierbarkeit des OpuB-Transporters nicht von der Anwesenheit des *gbsR*-Gens abhängt (Nau-Wagner, 1999). In den folgenden Experimenten sollte die Regulation des OpuB-Systems näher untersucht werden. Dazu wurden die beiden *B. subtilis* Stämme GNB66, welcher eine *opuB*-*treA*-Fusion trägt, und GNB68 verwendet. GNB68 trägt neben der *opuB*-*treA*-Fusion noch einen Defekt in *gbsR*-Gen. Beide Stämme wurden bei 37°C und 220 rpm in SMM-Medium bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,25 gezogen. Anschließend wurden die Kulturen mit 0,4 M NaCl versetzt. Nach 90 minütiger Inkubation wurden Proben entnommen und die TreA-Aktivität bestimmt (Abb. 27).



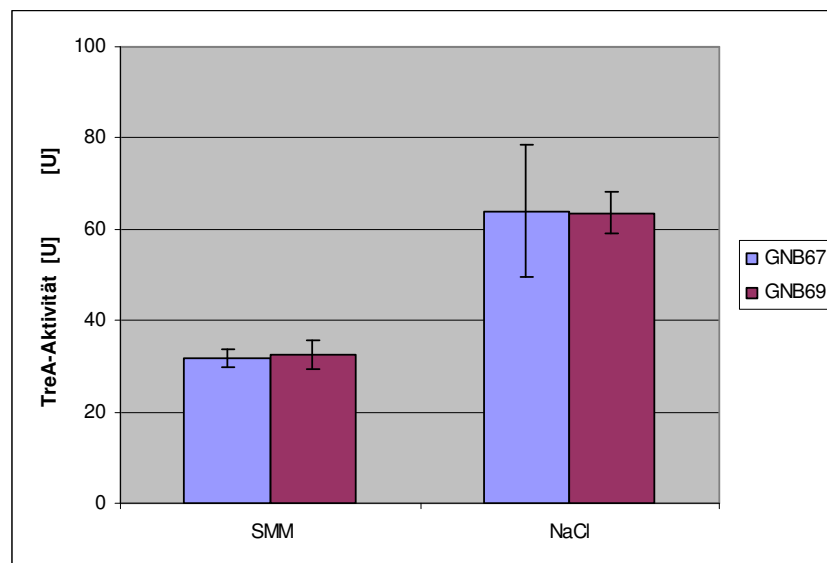
**Abbildung 27: TreA-Aktivität der *B. subtilis*- Stämme GNB66 (■) und GNB68 (■) unter verschiedenen Bedingungen.** Die Messung der TreA-Aktivität erfolgte 90 Minuten nach der Zugabe von 0,4 M NaCl .

Die TreA-Aktivität des Stammes GNB66 in SMM-Medium beträgt 20 Units. Nach Zugabe von 0,4 M NaCl zum Wachstumsmedium erreicht der Stamm GNB66 eine TreA-Aktivität von 63 Units. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine erhöhte Osmolarität die *opuB*-Expression induziert. Der Stamm GNB68, welcher eine Deletion im *gbsR*-Gen trägt, zeigt im Gegensatz zu GNB66 schon im SMM-Medium 10-fach höhere TreA-Aktivität (204 U). Durch die Zugabe von 0,4 M NaCl zum Wachstumsmedium erhöht sich die TreA-Aktivität weiter auf 355 Units. All diese Ergebnisse zeigen, dass nach einem Ausschalten des *gbsR*-Gens das *opuB*-Operon in höheren Maße exprimiert wird, die Induktion durch Salz bzw. erhöhte Osmolarität bleibt jedoch bestehen.

### 3.2 GbsR hat keinen Einfluss auf OpuC

In vorhergehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass GbsR die Cholininduktion durch OpuB vermittelt. OpuB ist ein ABC-Transporter in *B. subtilis*, welcher nur Cholin in die Zelle transportiert. OpuC hingegen transportiert eine Reihe von kompatiblen Soluten in die Zelle, unter anderem auch Cholin. Somit stellt sich die Frage, ob auch dieser ABC-Transporter durch GbsR beeinflusst wird. Um diese Frage zu klären, wurden die beiden *B. subtilis* Stämme GNB67, welcher eine *opuC*-*treA*-Fusion trägt, und GNB69 verwendet. GNB69 trägt neben der *opuC*-*treA*-Fusion noch eine Deletion im *gbsR*-Gen. Beide Stämme wurden bei 37°C und 220 rpm in SMM-Medium bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,25 gezogen,

anschließend erfolgte die Zugabe von 0,4 M NaCl. Nach 90 Minuten der Induktion wurden Proben entnommen und die TreA-Aktivität bestimmt (Abb. 28).



**Abbildung 28: TreA-Aktivität der *B. subtilis*- Stämme GNB67 (■) und GNB69 (■) unter verschiedenen Bedingungen.** Die Messung der TreA-Aktivität erfolgte 90 Minuten nach der Zugabe von 0,4 M NaCl.

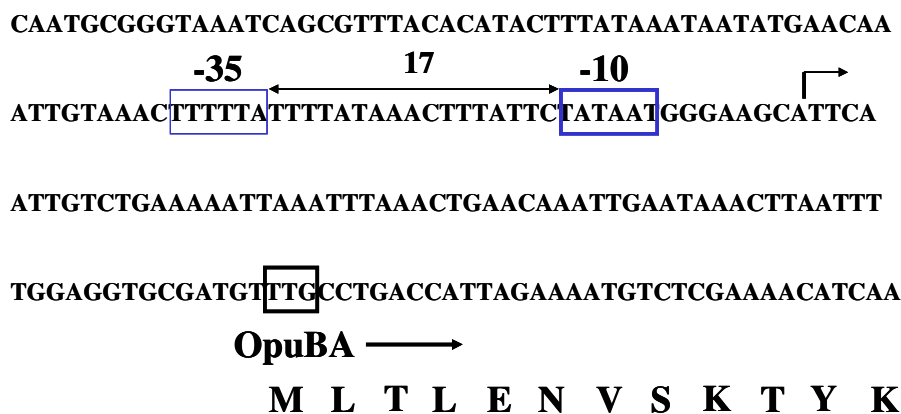
Die TreA-Aktivität des Stammes GNB67 in SMM-Medium beträgt 32 Units. Nach Zugabe von 0,4 M NaCl zum Wachstumsmedium erreicht der Stamm GNB67 eine TreA-Aktivität von 66 Units. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine erhöhte Osmolarität die *opuC*-Expression induzieren kann. Der Stamm GNB69, welcher eine Deletion im *gbsR*-Gen trägt, zeigt bei beiden Bedingungen keinen Unterschied in den TreA-Aktivitäten zu Stamm GNB67. All diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass die *opuC*-Expression durch erhöhte Osmolarität induziert wird und zum anderen, dass ein Ausschalten des *gbsR*-Gens keinen Einfluss auf die *opuC*-Expression hat.

### 3.3 Bestimmung der mRNA-Startpunkte des *opuB*-Transkriptes

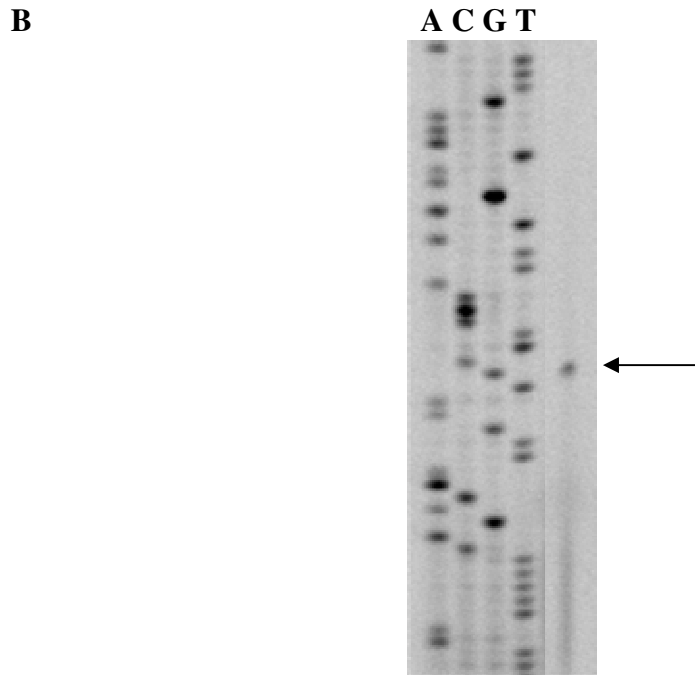
Zur Bestimmung des Promotors von *opuB* wurde der Transkriptionsstartpunkt durch Primer-Extension-Analyse kartiert. Dazu wurden die *B. subtilis*-Zellen des Stammes DHB8 in SMM bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,25 gezogen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,4 M NaCl zu den Kulturen. Nach 90 Minuten wurden die Zellen geerntet und die Gesamt-RNA daraus isoliert. Diese diente als Matrize in der Primer Extension Reaktion. Als Primer wurde ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD800 markiertes, *opuB*-spezifisches Oligonukleotid (PE-*opuBA*1) benutzt. Die mRNA wurde mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Unter Verwendung desselben Oligonukleotides (PE-*opuBA*1) wurde eine Sequenzreaktion mit dem Plasmid pDH5 als Matrize durchgeführt, welches die *yuaV-opuBA*-Genregion enthält. Diese Sequenzierungsreaktion wurde als Größenstandard neben den Produkten der reversen Transkription in einem Sequenzgel aufgetrennt und mit Hilfe eines Licor DNA-Sequencer analysiert (Abb. 29).

Vor dem identifizierten Startpunkt des *opuB*-Transkriptes befindet sich in der bestimmten Sequenz jeweils eine potentielle -10 und -35 Region mit 17 bp Abstand zueinander. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Versuchen zur Bestimmung der des mRNA-Startpunktes überein (Kappes *et al.*, 1999).

A





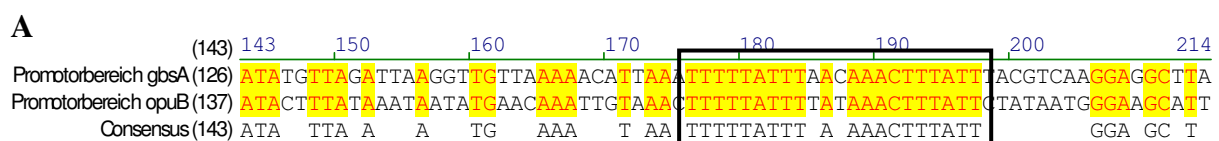


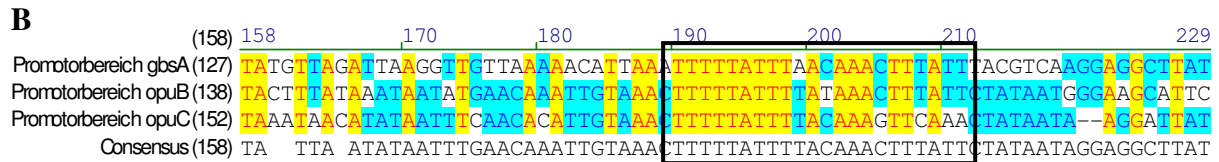
**Abbildung 29: Primer Extension-Analyse der *opuB*-Promotorregion.**

(A) Nukleotidsequenz der *opuB*-Promotorregion aus *B. subtilis*. Die Initiationsstelle der Transkription ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die -10 und -35 Region des Promotors sind mit einem Rahmen um die jeweiligen Nukleotide markiert (B) Identifikation des transkriptionellen Startpunktes des *opuB*-Operons von *B. subtilis* und Analyse des potentiellen Promotors. *B. subtilis* wurde in Minimalmedium bei 37 °C kultiviert, bis die Kultur eine OD<sub>578</sub> von 0,25 erreichte. Dann erfolgte die Zugabe von 0,4 M NaCl. Nach 90 min wurden die Zellen geerntet. Jeweils 20µg der isolierten Gesamt-RNA wurden mit einem *opuB*-spezifischen DNA-Primer von einer reversen Transkriptase in cDNA transkribiert. Dieses Reaktionsprodukt wurde neben einer DNA-Sequenzierungsreaktion die mit denselben Oligonukleotiden erhalten wurde, in einem Sequenziergel aufgetrennt.

#### 4. Identifizierung einer möglichen Bindebox für GbsR

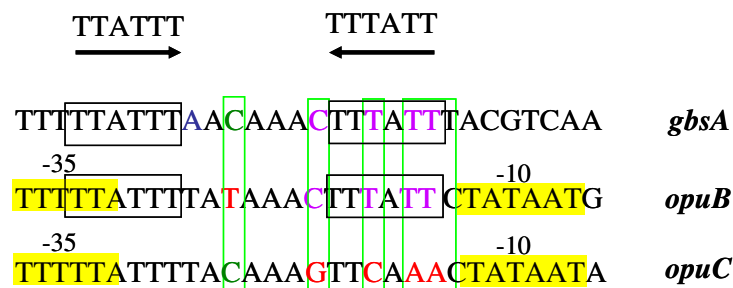
Durch die bisherigen Ergebnisse wurde ermittelt, dass GbsR sowohl an der Regulation der Glycin Betain Synthese, als auch an der Vermittlung des Transportes von Cholin durch OpuB beteiligt ist. Demnach muss sowohl im *gbsAB*-Promotorbereich als auch im *opuB*-Promotorbereich eine Bindestelle für GbsR vorhanden sein, da GbsR keinen Einfluß auf OpuC hat, sollte diese mögliche Bindestelle im *opuC*-Promotorbereich fehlen. Um dies zu untersuchen wurden Sequenzen aller drei Promotorbereiche analysiert (Abb. 28A und B).





**Abbildung 30: Ausschnitt aus den Alignments der Promotorregionen *gbsA*, *opuB* und *opuC*.** In (A) ist ein Ausschnitt des Alignments der *gbsA*-und *opuB*-Promotorregion dargestellt. Abbildung (B) zeigt einen Ausschnitt des Sequenzvergleiches aller drei Promotorregionen.

Wie Abbildung 30 A zu entnehmen ist, wurden in der Region hinter dem *gbsA*-Promotor und in der *opuB*-Promotorregion übereinstimmende Sequenzbereiche gefunden, aus denen sich ein Inverted Repeat ableiten lässt (Abb. 31). Das Alignment aller drei intergenen Bereiche hingegen zeigt, dass dieses gefundene Muster in der *opuC*-Promotorregion nicht zu finden ist. Aufgrund dieser Tatsache könnte es sich hier um die mögliche Bindestelle des GbsR-Proteins handeln.



**Abbildung 31: Das mögliche Bindemotiv des GbsR-Regulators.**

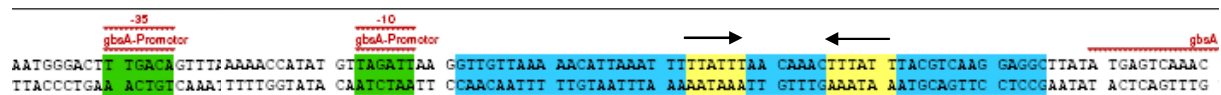
#### 4.1 EMSA der identifizierten möglichen Bindebox von GbsR

Um zu klären, ob es sich bei dem durch Alignments identifizierten Sequenzabschnitt um die mögliche Bindestelle für GbsR handelt, wurden EMSA-Tests durchgeführt. Zunächst wurden 50 bp große Fragmente, welche die mögliche Bindestelle enthielten, aus der *gbsAB*-Intergenregion und der *opuB*-Promotorregion mittels PCR amplifiziert. Auch die 50 bp große, ermittelte Region aus dem Promotorbereich von *opuC*, welche dieses Motiv nicht aufweist, wurde mittels PCR amplifiziert. Als Template diente chromosomale *B. subtilis* DNA des Stammes JH642. Um später die DNA detektieren zu können, wurden Primer, welche mit dem fluoreszierenden Farbstoff Cy5 markiert sind, für die PCR eingesetzt (siehe Tabelle 8). In den Reaktionsansätzen wurden 250 ng Cy5-markiertes PCR-Produkt und 250 ng nicht markierte Competitor-DNA mit unterschiedlichen Mengen an gereinigtem GbsR-Protein in einem DNA-Bindepuffer (100mM TrisHCl pH 7,5; 150mM NaCl, 1mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 5% Glycerin,

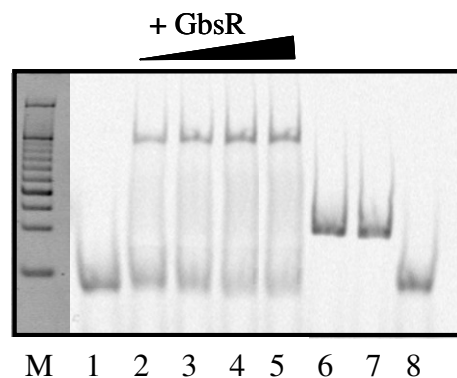
50 µg/ml BSA (Filée *et al.*, 2001)) für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf ein TAE-Polyacrylamidgel aufgetragen (8% Acrylamid) und in 1 x TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt (70 V). Das Gel wurde dann auf einem Phosphorimager (Storm 860, Amersham Biosciences) gescannt (Red Fluorescence). Die DNA-Markerbande wurde vor dem Scannen abgeschnitten und die DNA in einem Ethidiumbromidbad sichtbar gemacht (Abb. 32)

Als Negativkontrollen dienten wie in 2.4.1 zum einen ein Reaktionsansatz ohne das Protein GbsR, ein 100 bp großes DNA-Fragment aus einer anderen Region des *B. subtilis* Chromosoms (*yitM*), welches anstelle des Fragmentes aus der *gbsAB*-Promotorregion mit GbsR inkubiert wurde und zum anderen ein Reaktionsansatz, in dem das 50 bp große Fragment aus der *gbsAB*-Promotorregion mit BSA inkubiert wurde.

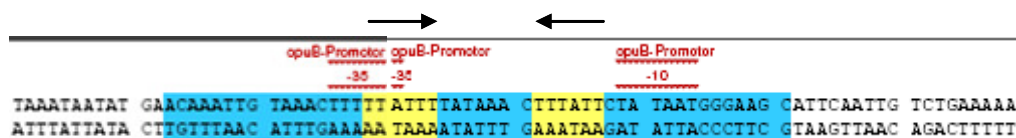
## A1

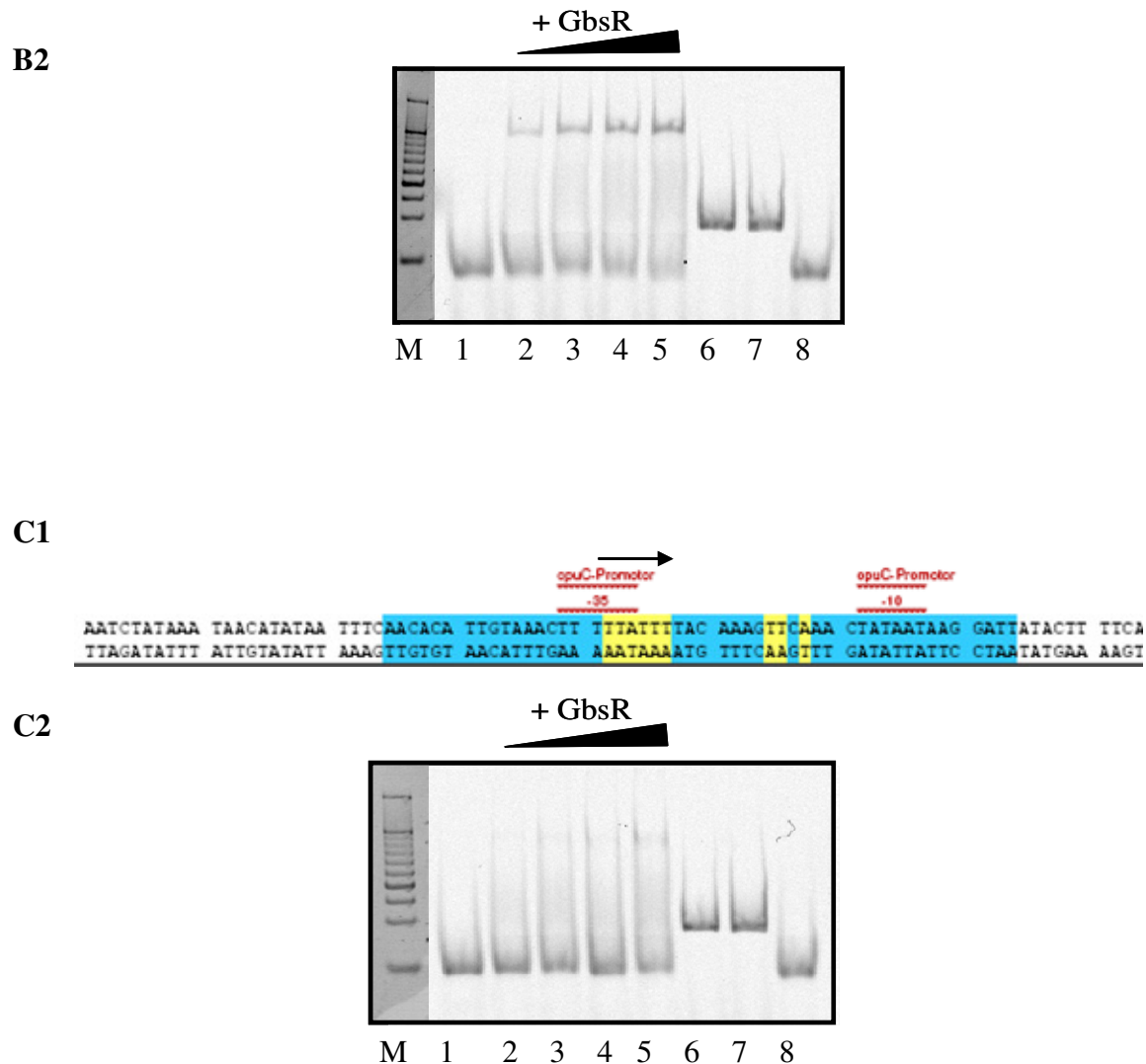


## A2



## B1





**Abbildung 32: EMSA der möglichen Bindebox von GbsR.**

In **A1**, **B1**, **C1** dargestellt ist ein Teil der Promotoregion von *gbsAB* (**A**), von *opuB* (**B**) und von *opuC* (**C**). Blau hinterlegt ist jeweils das PCR-Fragment, welches mittels fluoreszenzmarkierter (Cy5) markierter Primer amplifiziert und für den EMSA eingesetzt wurde. Gelb markiert ist das Bindemotiv. Diese 50 bp großen Fragmente wurden mit GbsR inkubiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt (**A2**, **B2**, **C2**). Die Laufweite der Promotorfragmente wurden mittels Fluoreszenzdetektion ermittelt. Als Marker wurde der O'RangeRuler™ 50 bp DNA Ladder von Fermentas verwendet. **1:** 250 ng PCR-Fragment (50 bp) ohne GbsR; **2:** 250 ng PCR-Fragment (50 bp) inkubiert mit 50 ng GbsR; **3:** 250 ng PCR-Fragment (50 bp) inkubiert mit 75 ng GbsR; **4:** 250 ng PCR-Fragment (50 bp) inkubiert mit 100 ng GbsR; **5:** 250 ng PCR-Fragment (50 bp) inkubiert mit 150 ng GbsR; **6:** 250 ng Kontroll-DNA *yitM* (100 bp) aus *B. subtilis* ohne GbsR; **7:** 250 ng Kontroll-DNA *yitM* (100 bp) aus *B. subtilis* inkubiert mit 100 ng GbsR als Negativkontrolle; **8:** 250 ng PCR-Fragment (50 bp) inkubiert mit 100 ng BSA als Negativkontrolle.

Die Analyse der Gele ergab, dass nach der Inkubation mit gereinigtem GbsR sowohl das *gbsAB*-Intergenfragment, als auch das *opuB*-Promotorfragment eine andere Laufweite als die Kontrollen der Fragmente ohne GbsR zeigten. Zu sehen ist auch, dass die „geshiftete“ Bande mit Zunahme der Proteinkonzentration stärker wird. Alle anderen Kontrollen hingegen

zeigten dieselbe Laufweite wie die Kontrolle ohne GbsR. Die Auswertung des EMSA mit dem *opuC*-Promotorfragment hingegen, zeigt keine veränderten elektrophoretischen Eigenschaften. Es ist kein deutlicher Shift erkennbar. Diese Beobachtungen besagen zum einen, dass GbsR spezifisch die DNA der *gbsAB*-Intergenregion und die DNA der *opuB*-Promotorregion bindet, denn die Kontrollen mit einem anderen DNA-Fragment zeigen keinen Shift und somit keine Bindung (Abb. 32 A2, B2, C2 Spur 7). Auch ist der Shift wie schon zuvor nicht durch das PCR-Fragment verursacht, denn eine Kontrolle mit BSA liefert keine veränderte Laufweite. Zum anderen kann gesagt werden, dass GbsR nicht an die *opuC*-Promotorregion bindet. Dies ist in Übereinstimmung mit den zuvor schon gezeigten genetischen Daten.

## 5. GbsR bindet Cholin

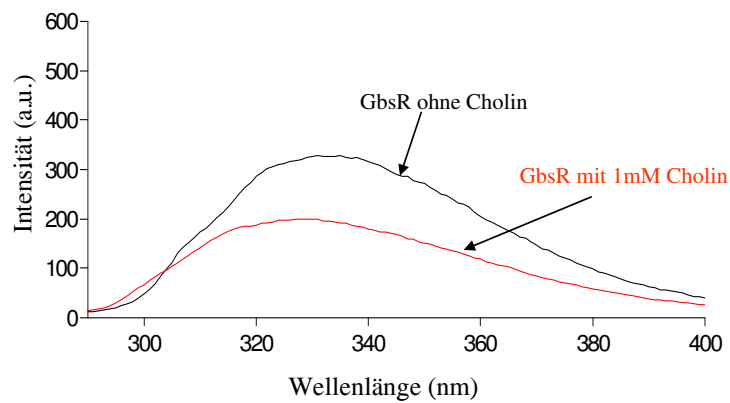
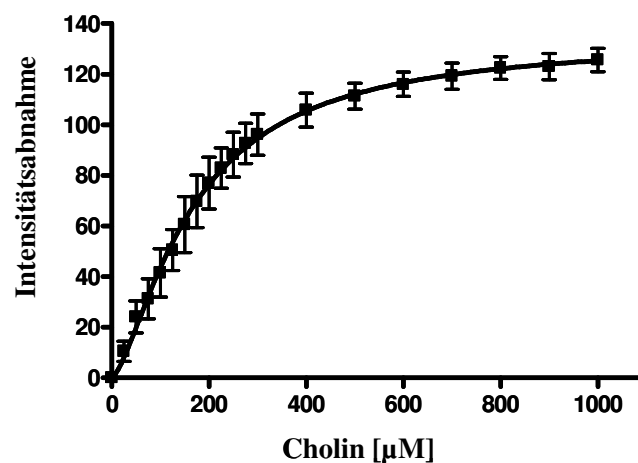
Dass Cholin als Induktor für die Expression des *gbsAB*-Operons dient, konnte bereits genetisch gezeigt werden, auch dass die Cholininduktion durch GbsR vermittelt wird, wurde klar etabliert. Interessant ist nun die Frage wie Cholin und GbsR zusammenwirken, d.h. wird Cholin von dem Repressor GbsR gebunden. Um diese Frage zu klären, wurden Bindestudien mit Hilfe eines fluoreszenzspektroskopischen Assays durchgeführt. Dazu wurde das gereinigte Protein mit Cholin inkubiert und anschließend bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm vermessen. Es wurde ein Emissionsspektrum von 290 nm bis 400 nm aufgenommen. Abb. 33 A zeigt das aufgenommene Fluoreszenzspektrum für GbsR ohne Substrat und mit 1 mM Cholin, einer Substratkonzentration bei der ein deutlicher Einfluß des Cholins auf GbsR zu erwarten ist. Deutlich ist eine Änderung in der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Die Messung wurde bei einer Proteinkonzentration von 5 µM GbsR durchgeführt. Die Änderung der Fluoreszenzintensität ist abhängig von der Substratkonzentration. Für Cholin erfolgte die Berechnung der Bindungsaffinität über die Abnahme des Intensitätsmaximums in Abhängigkeit von der Cholin-Konzentration. Die Auftragung der Intensitätsabnahme gegen die Ligandenkonzentration zeigt eine Sättigungskurve, die den von Michaelis-Menten aufgestellten Gesetzmäßigkeiten folgt:

$$F = F_0 + (\Delta F * [S_0]/([S_0] + K_D))$$

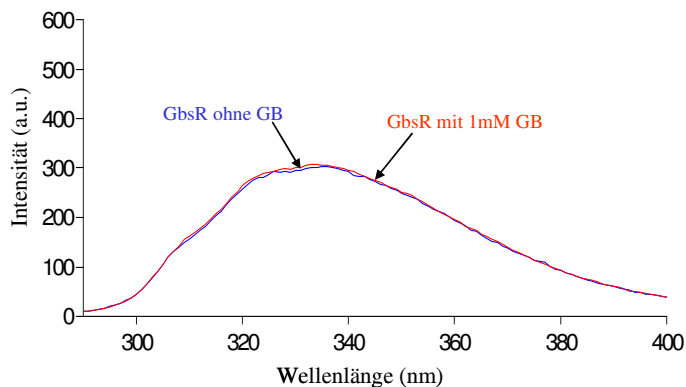
F                    =        theoretische Fluoreszenzintensität für eingesetzte Substratkonzentration

$F_0$	=	gemessene Fluoreszenzintensität ohne Substrat
$\Delta F$	=	maximale Änderung der Fluoreszenzintensität
$S_0$	=	bei dieser Messung eingesetzte Substratkonzentration
$K_D$	=	Bindungskonstante, Maß für die Affinität eines Proteins zu seinem Substrat; gibt an, bei welcher Substratkonzentration das Protein halbmaximal mit Substrat abgesättigt ist

Die Berechnung der  $K_D$  für Cholin erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego CA, USA). Bei der Berechnung der  $K_D$  wurde der Hill-Koeffizient mit einbezogen. Für Cholin beträgt die ermittelte Bindungsaffinität ( $K_D$ ) **165  $\mu\text{M} \pm 15 \mu\text{M}$** .

**A****B**

C



**Abbildung 33:** Gezeigt sind die Fluoreszenzspektren ohne und mit den jeweiligen Substraten (A) Cholin, (C) Glycin Betain, sowie die Sättigungskurve, die sich bei der Auftragung der Intensitätsänderungen von GbsR, in Abhängigkeit von Cholin, gegen die Substratkonzentration ergibt (B). Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Messungen mit Standardabweichung.

Die kritische Frage, ob in dem fluoreszenzspektroskopischen Assay tatsächlich eine Bindung des Induktors durch das GbsR-Protein gemessen wurde oder ein unspezifischer Effekt, abhängig von der Erhöhung der Teilchenkonzentration in der Proteinlösung, ließ sich mit einer Messung beantworten, in der Ectoin als Ligand eingesetzt wurde, denn Ectoin hat keinen Einfluss auf die *gbsAB*-Expression (siehe IV.1.2.2.6). Es ergab sich keine Intensitätsänderungen (Daten nicht gezeigt). Somit ist gezeigt worden, dass mit dieser fluoreszenzspektroskopischen Methode tatsächlich eine spezifische Bindung von Cholin an das GbsR-Protein gemessen wurde.

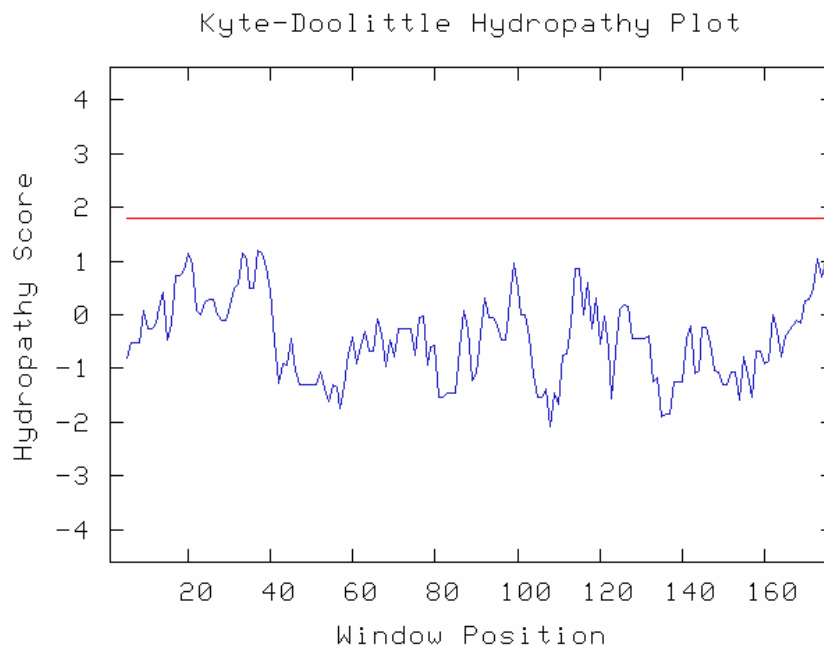
In IV.1.1.2.8 wurde gezeigt, dass Glycin Betain einen reprimierenden Effekt auf die *gbsAB*-Expression ausübt, welcher durch GbsR vermittelt wird. Somit wurde auch GbsR mit Glycin Betain inkubiert und anschließend bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm vermessen. Es wurde ein Emissionsspektrum von 290 nm bis 400 nm aufgenommen. Abb. 33 C zeigt das aufgenommene Fluoreszenzspektrum für GbsR ohne Substrat und mit 1 mM Glycin Betain. Glycin Betain bewirkt keine Änderung der Fluoreszenzintensität von GbsR. Laut den fluoreszenzspektroskopischen Daten wird Glycin Betain demnach nicht durch das den Repressor GbsR gebunden.

## 6. Bioinformatische Charakterisierung von GbsR

### 6.1 In silico-Analyse von GbsR

Das *gbsR*-Gen umfasst 540 bp, das kodierte Protein GbsR hat eine Länge von 180 Aminosäuren und damit eine berechnete Molmasse von 20924.6 g/mol (ca. 21 kDa). Der Isoelektrische Punkt liegt laut Berechnung bei einem pH-Wert von 4,62 (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>).

Eine Hydrophobizitätsanalyse (siehe Abb. 34) nach Kyte und Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982) (<http://gcat.davidson.edu/rakarnik/kd.cgi>) ergab, dass es sich bei GbsR um ein hydrophiles Protein handelt, welches sich im Cytoplasma befindet. Weitere Strukturanalysen mit dem MRLC Programm (Guerneur *et al.*, 1999) ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_mlrc.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_mlrc.html)) zeigen vor allem ausgeprägte alphahelikale Bereiche in GbsR (ca. 72 %). Es existieren nur sehr wenige Bereiche, in denen  $\beta$ -Faltblattstrukturen ausgebildet werden können (ca. 8 %) (Abb. 35). Alphahelices sind an der Interaktion von DNA-bindenden Proteinen mit der DNA beteiligt.

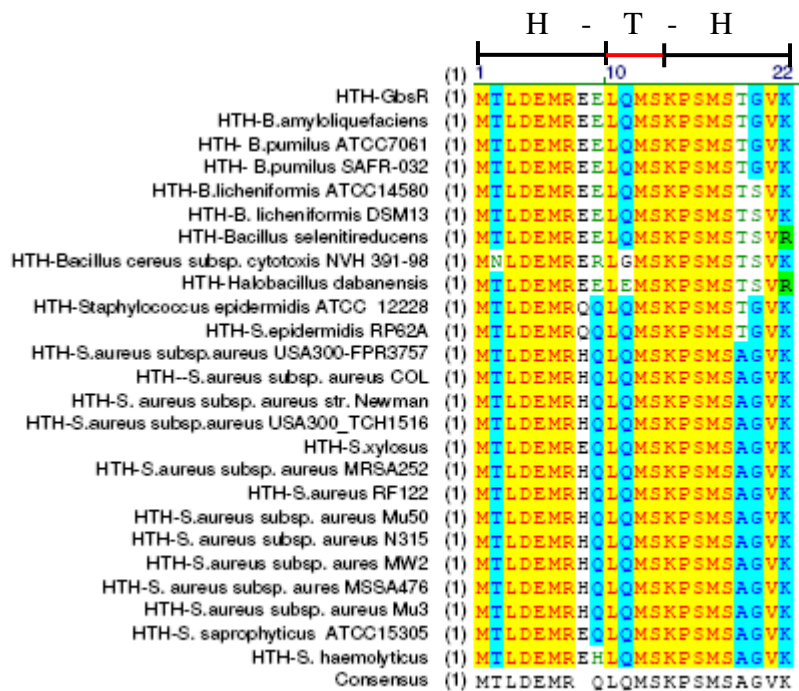


**Abbildung 34: Hydrophobizitätsanalyse von GbsR nach Kyte und Doolittle.**

Die statistischen Daten der Abfrage lauten: Window Size = 9, Start Position = 1, End Position = 180, Query Length = 180, Effective Length = 172. Es ist zu sehen, dass sich bei dem GbsR-Hydrophobizitätsplot kein Peak oberhalb der roten Linie befindet. Dies bedeutet, dass keine transmembrane Regionen vorhanden sind. Bei GbsR handelt es sich demnach um ein cytoplasmatisches Protein.







**Abbildung 37: Alignment der möglichen Helix-Turn-Helix-Motive.**

Dargestellt sind die möglichen HTH-Motive aus den Proteinsequenzen von GbsR und von GbsR-homologer Proteinen. Die Sequenzen stammen aus verschiedenen *Bacilli* und *Staphylococci*. Für *Staphylococcus aureus* sind nur einige Vertreter dargestellt. Gelb unterlegt sind die identischen Aminosäuren, blau unterlegt die konservierten Aminosäuren und grün die ähnlichen Aminosäuren.

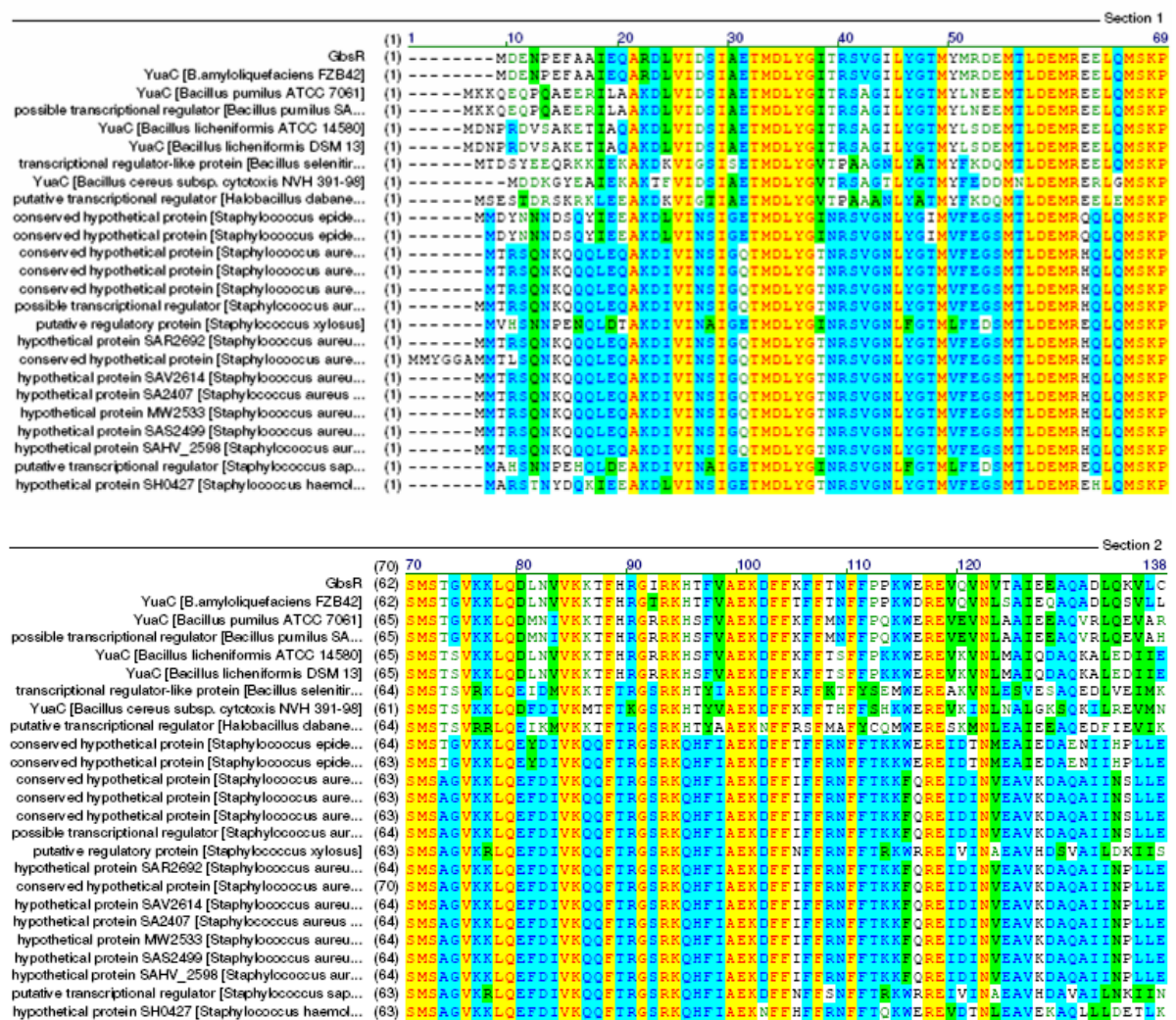
## 6.2 Datenbankanalyse zur Verbreitung und Organisation des GbsR Regulatorproteins anhand eines Sequenzvergleiches mit GbsR aus *Bacillus subtilis*

Datenbankanalysen (NCBI-Datenbank) mit der Aminosäuresequenz des GbsR Proteins mit dem BLAST-Algorithmus nach Altschul (Altschul *et al.*, 1997) zeigten eine Verbreitung der GbsR ähnlichen Proteine innerhalb der *Bacteria*, genauer in der Ordnung *Bacillales*. Das heißt GbsR ist nur in einigen *Bacillen* und *Staphylococci* zu finden (Abb. 38).

Weitere Analysen der Nachbarschaft-Regionen zeigten, dass sich die GbsR-ähnlichen Proteine in drei Gruppen einteilen lassen. Gruppe 1 beinhaltet all die Proteine, die sich als Regulatorgen in der Nähe der Glycin Betain Synthesegene befinden. Zu dieser Gruppe zählen GbsR-ähnliche Proteine aus den *Bacillen* und *Staphylococci*. Die *Staphylococci* zeigen in ihrer Genanordnung jedoch eine Besonderheit, dort liegt das GbsR-ähnliche Protein zwischen den Glycin Betain Synthesegenen und dem Gen für einen Cholin-Transporter. In Gruppe 2 handelt es sich um GbsR-ähnliche Proteine, die sich neben den Genen für einen vermuteten

Transporter für kompatible Solute befinden (z.B. OpuA, OpuB und OpuC). Gruppe 3 beinhaltet GbsR-ähnliche Proteine, die weder in der Nähe von Glycin Betain Synthesegenen noch in der Nähe eines Transporters für kompatible Solute lokalisiert sind. Zu dieser Gruppe zählt unter anderem das Mj223-Protein aus *M. jannaschii*. Abbildung 39 zeigt je Beispiele für die Gruppen.

Laut den Datenbankanalysen konnte GbsR als Regulatorprotein keiner bekannten Familie zugeordnet werden. Allerdings weist das GbsR-Protein eine Zuordnung zu der COG1510, einem Cluster der orthologen Gruppe 1015, auf, welche das Protein als transkriptionellen Regulator identifiziert.

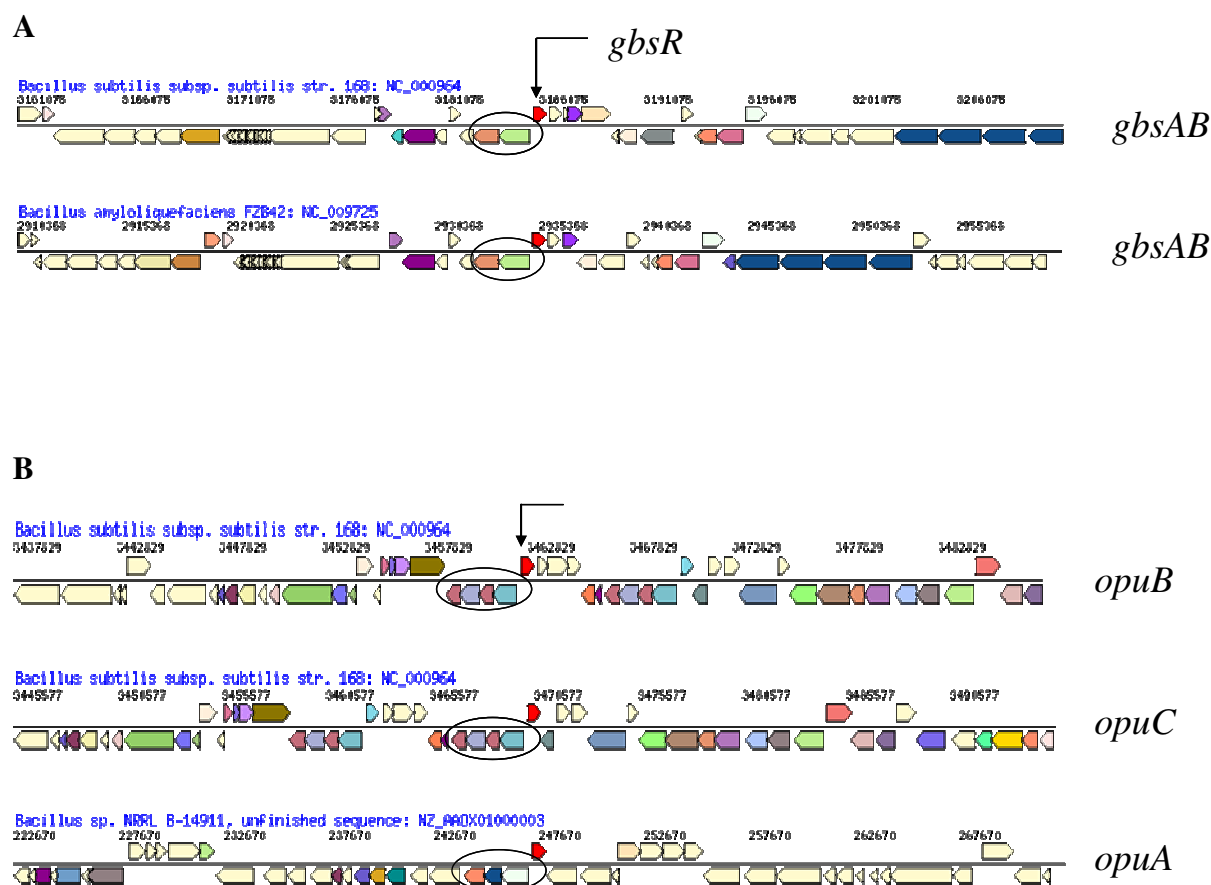


Section 3

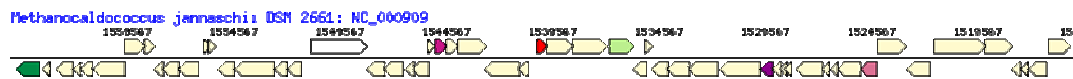
	(139)	139	150	160	170	180	194											
GbsR (131)	KEDLD	EDIKNEALQ	YDQLSS	KAYVWIKRRLAEISVIGSIF	ETK----													
YuaC [B.amyloliquefaciens FZB42] (131)	EEGN	AELQEARQ	YDQLSS	KAYVWIKRRLAEISVIGSIF	ETDEKNA--													
YuaC [Bacillus pumilus ATCC 7061] (134)	DDQL	EAHIREEAQ	QIEQLSS	KAYVWIKRRLAEISVIGSIF	FDQKDK----													
possible transcriptional regulator [Bacillus pumilus SA....] (134)	DDQL	EAHIREEAQ	QIEQLSS	KAYVWIKRRLAEISVIGSIF	FDQKDK----													
YuaC [Bacillus licheniformis ATCC 14580] (134)	EEGL	EDIKEEART	YDQLSS	KPYVWIKRRLAEISVIGSIF	ETDNKK----													
YuaC [Bacillus licheniformis DSM 13] (134)	EEGL	EDIKEEART	YDQLSS	KPYVWIKRRLAEISVIGSIF	ETDNKK----													
transcriptional regulator-like protein [Bacillus selenitri....] (133)	DANS	FDIVA	EKQY	YDQLSS	KPYVWIKRRLAEISVIGSIF	ETDNKK----												
YuaC [Bacillus cereus subsp. cytotoxic NVH 391-98] (130)	NCE	EAIKHA	KQY	YEQLSS	KPYVWIKRRLAEISVIGSIF	ETDNKK----												
putative transcriptional regulator [Halobacillus dabane....] (133)	DAS	FDIVA	EKQY	YDQLSS	KPYVWIKRRLAEISVIGSIF	ETDNKK----												
conserved hypothetical protein [Staphylococcus epide....] (133)	KND	DEEVKQ	AIN	YDQLSS	KPYVWIKRRLAEISVIGSIF	ETDNKK----												
conserved hypothetical protein [Staphylococcus epide....] (132)	KND	DEEVKQ	AIN	YDQLSS	KPYVWIKRRLAEISVIGSIF	ETDNKK----												
conserved hypothetical protein [Staphylococcus aure....] (132)	SSDL	TEAEI	QEA	KIK	QDHT	HVY	WLEQLTEAIESGSIFRKYFFIP	PS	DS	SEN								
conserved hypothetical protein [Staphylococcus aure....] (132)	SSDL	TEAEI	QEA	KIK	QDHT	HVY	WLEQLTEAIESGSIFRKYFFIP	PS	DS	SEN								
conserved hypothetical protein [Staphylococcus aure....] (132)	SSDL	TEAEI	QEA	KIK	QDHT	HVY	WLEQLTEAIESGSIFRKYFFIP	PS	DS	SEN								
possible transcriptional regulator [Staphylococcus aure....] (133)	SSDL	TEAEI	QEA	KIK	QDHT	HVY	WLEQLTEAIESGSIFRKYFFIP	PS	DS	SEN								
putative regulatory protein [Staphylococcus xylosus] (132)	DIN	DEATK	SALE	TCQ	QV	VG	LP	Y	WLEQLTEAIESGSIFRKYFFIP	PS	DS	SEN						
hypothetical protein SAR2692 [Staphylococcus aureus....] (133)	SSDL	TEAEI	QEA	KIK	QDHT	HVY	WLEQLTEAIESGSIFRKYFFIP	PS	DS	SEN								
conserved hypothetical protein [Staphylococcus aure....] (139)	SSDL	TEAEI	QEA	KIK	QDHT	HVY	WLEQLTEAIESGSIFRKYFFIP	PS	DS	SEN								
hypothetical protein SAV2614 [Staphylococcus aureus....] (133)	SSDL	TEAEI	QEA	KIK	QDHT	HVY	WLEQLTEAIESGSIFRKYFFIP	PS	DS	SEN								
hypothetical protein SA2407 [Staphylococcus aureus ....] (133)	SSDL	TEAEI	QEA	KIK	QDHT	HVY	WLEQLTEAIESGSIFRKYFFIP	PS	DS	SEN								
hypothetical protein MW2533 [Staphylococcus aureus....] (133)	SSDL	TEAEI	QEA	KIK	QDHT	HVY	WLEQLTEAIESGSIFRKYFFIP	PS	DS	SEN								
hypothetical protein SAS2499 [Staphylococcus aureus....] (133)	SSDL	TEAEI	QEA	KIK	QDHT	HVY	WLEQLTEAIESGSIFRKYFFIP	PS	DS	SEN								
hypothetical protein SAHV_2598 [Staphylococcus aur....] (133)	SSDL	TEAEI	QEA	KIK	QDHT	HVY	WLEQLTEAIESGSIFRKYFFIP	PS	DS	SEN								
putative transcriptional regulator [Staphylococcus sap....] (132)	DEST	DAIK	ET	AN	ET	AN	ET	AN	ET	AN	ET	AN	ET	AN	ET	AN	ET	AN
hypothetical protein SH0427 [Staphylococcus haemol....] (132)	N	ED	D	HARA	VDR	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q

Abbildung 38: Sequenzvergleiche GbsR-homologer Proteine.

Dargestellt sind die Proteinsequenzen GbsR-homologer Proteine. Die Sequenzen stammen aus verschiedenen Bacilli und Staphylococci. Für *Staphylococcus aureus* sind nur einige Vertreter dargestellt. Gelb unterlegt sind die identischen Aminosäuren, blau unterlegt die konservierten Aminosäuren und grün die ähnlichen Aminosäuren.



C



**Abbildung 39: Dargestellt sind die Nachbarregionen von GbsR und GbsR-ähnlichen Proteine.**

Das Strukturgen *gbsR* ist rot dargestellt, die Organisation der direkten Gen-Nachbarschaft farblich aufgeführt. Schwach gelb markierte Gene besitzen keine COG- (= selbe orthologe Gruppe) Zuweisung.

**A** zeigt Proteine der Gruppe 1, in **B** sind Proteine der Gruppe 2 dargestellt und **C** beinhaltet Proteine der Gruppe 3. Das GbsR Protein bzw. die GbsR-ähnlichen Proteine sind zusätzlich durch einen Pfeil gekennzeichnet. Rechts sind jeweils die benachbarten Gene aufgelistet. Dabei steht *gbsAB* bzw. *betAB* für die Glycin Betain Synthesegene, *opuA-C* für die jeweiligen Transportsysteme, *cudT* für einen Cholintransporter und *betT* für einen GB-Transporter.

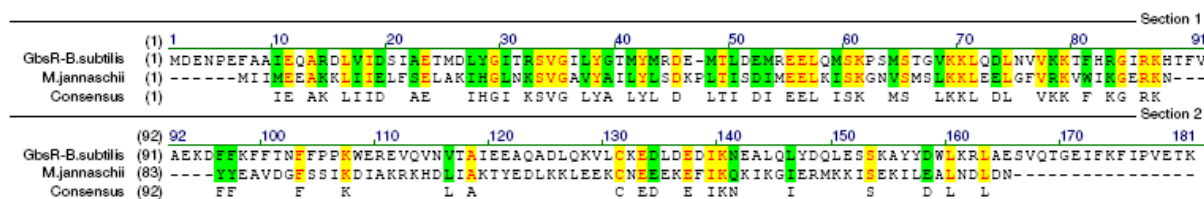
Bei einem durchgeführten Alignment der GbsR Aminosäuresequenz von *B. subtilis* mit acht verwandten *Bacillus*-Stämmen konnte eine hohe Sequenzähnlichkeit festgestellt werden (s. Abb. 36). Fünf der Stämme weisen eine Sequenzidentität von über 75 % (*B. amyloliquefaciens* (FZB42): 87 %; *B. licheniformis* (ATCC 14580; DSM 13): 78 %; *B. pumilus* (ATCC 7061; SAFR-032): 77 %) zu der *B. subtilis* GbsR-Aminosäuresequenz auf. Bei *B. cereus* (subsp. Cytotoxis NVH 391-98) beträgt die Sequenzübereinstimmung 60 %, bei *B. selenitireducens* (MLS10) 59 % und bei *Halobacillus dabanensis* 56 %. Bei den folgenden Staphylococcen liegt die Sequenzidentität immerhin noch zwischen 57 % und 53 %.

Darüberhinaus wurde für das Gen *gbsR* ein Neighbourhood-Alignment (<http://imgweb.jgi-psf.org/cgi-bin/w/main.cgi>) durchgeführt. Diese Methode soll Aufschluss darüber geben, wie die direkte Gennachbarschaft von *gbsR* organisiert ist. Wie bereits erwähnt, ist aus dem Neighbourhood-Alignment zu erkennen, dass sich die GbsR-ähnlichen Proteine in drei Gruppen einteilen lassen. Das gesamte Neighbourhood-Alignment ist im Anhang D zu sehen.

### 6.3 Analyse von GbsR mit Hilfe von Mj223 aus *M. jannaschii*

Datenbankanalysen mit der Aminosäuresequenz des GbsR Proteins mit dem BLAST-Algorithmus nach Altschul (Altschul *et al.*, 1997) zeigten weiter eine Sequenzidentität von 34 % zu einem Protein aus *Methanococcus jannaschii* DSM 2661 (Abb. 40). Für dieses Protein liegt eine Röntgenstruktur vor (Abb. 42 A). Für weitere Charakterisierungen von GbsR wurde diese Struktur zur Hilfe genommen.





**Abbildung 40: Alignment des GbsR-Proteins mit dem GbsR-homologen Protein aus *M. jannaschii*.**

Dargestellt sind die Proteinsequenzen von GbsR und von dem GbsR-homologen Protein aus *M. jannaschii*. Die Sequenzenidentität beträgt 34 %. Gelb unterlegt sind die identischen Aminosäuren und grün die ähnlichen Aminosäuren.

Das Mj223-Protein aus *M. jannaschii* umfasst 152 bp und besitzt damit eine berechnete Molmasse von 17607.64 g/ mol (ca. 18 kDa). Strukturanalysen mit dem MRLC Programm (Guermeur et al., 1999) ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_mlrc.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_mlrc.html)) zeigen wie im GbsR-Protein vor allem ausgeprägte alphahelikale Bereiche (ca. 68 %). Es existieren ebenfalls wie in GbsR nur sehr wenige Bereiche, in denen  $\beta$ -Faltblattstrukturen ausgebildet werden können (ca. 9 %) (Abb. 41).

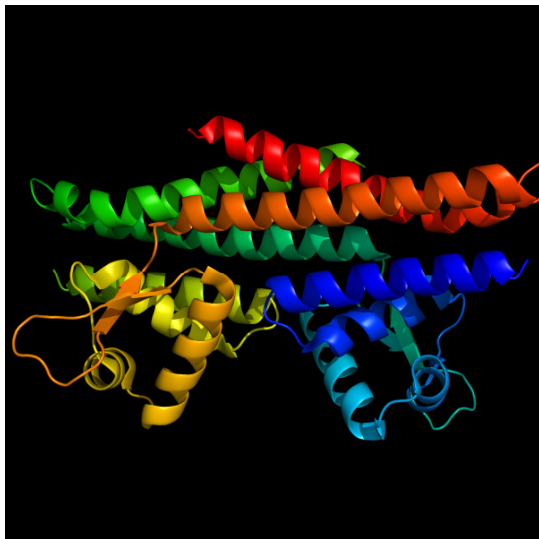


**Abbildung 41: Sekundär-Strukturanalyse von Mj223 aus *M. jannaschii*.**

Die alphahelikalen Bereiche, nehmen mit ca. 68 % einen großen Teil der Struktur ein. Es sind nur ca. 9 %  $\beta$ -Faltblattstrukturen enthalten.

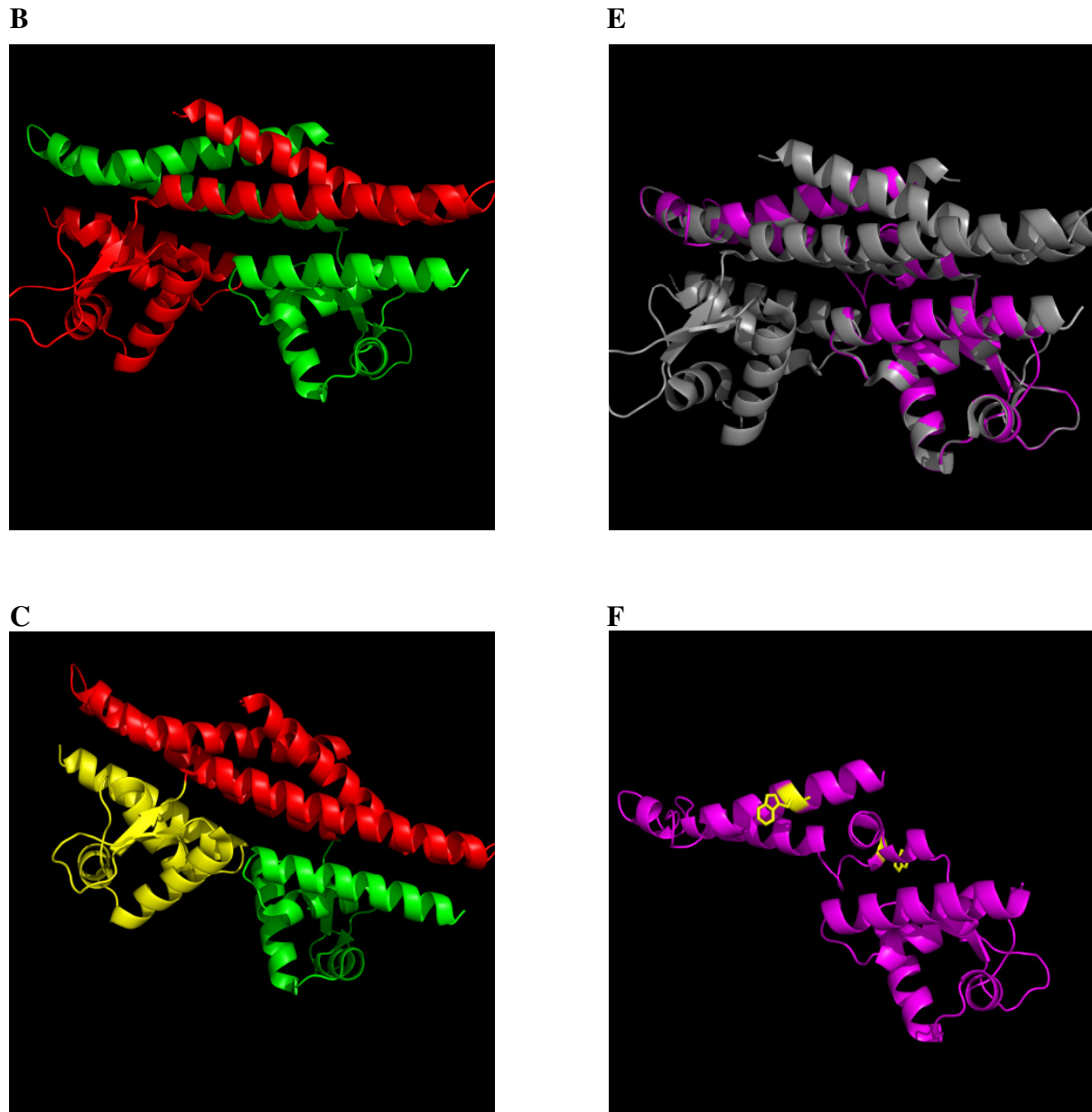
Mit Hilfe der Kristallstruktur von Mj223 (Accession number: NP\_248571) aus *M. jannaschii* konnte über die Internetseite <http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html> ein Modell von GbsR entwickelt werden, dass die mögliche Struktur des GbsR-Proteins aus *B. subtilis* zeigt. Bei dem Mj223-Protein aus *M. jannaschii* handelt es sich um ein Homodimer mit einem Helix-Turn-Helix-Motiv am N-Terminus des Proteins. Es gehört in die Klasse der winged Helix-Proteine. Abbildung 42 A zeigt die Kristallstruktur dieses Proteins. In Abbildung 42 B Sind die einzelnen Monomere durch farbliche Kennzeichnung voneinander unterschieden. Abbildung 42 C zeigt durch farbliche Abgrenzung die DNA-Bindedomänen. Mit Hilfe eines Programms Swiss-Model konnte die in Abbildung 42 D gezeigte Struktur eines GbsR-Monomers modelliert werden. Abbildung 42 E zeigt das Mj223-Homodimer überlagert mit einem GbsR-Monomer. Zu sehen ist, dass sich die beiden Proteine sehr ähnlich sind. In Abbildung 42 F ist das gemodelte Monomer des GbsR-Proteins zu sehen. Die beiden Tryptophane des Proteins, welche zur Messung der Cholin-Bindung beisteuerten sind herausgestellt.

A



D





**Abbildung 42: Kristallstruktur von Mj223 und das Modell von GbsR.**

In **A**, **B**, **C** ist die Kristallstruktur des Mj223-Proteins als Homodimer dargestellt. **B** zeigt durch die Farben rot und grün die einzelnen Monomere des Proteins. In **C** sind die DNA-Bindedomänen der einzelnen Monomere farblich unterschieden (gelb und grün). **D** zeigt das entwickelte Modell für ein GbsR-Monomer. In Abbildung **E** ist das Monomer des entwickelten Modells für GbsR über die Struktur von Mj223 gelegt worden, um Ähnlichkeiten festzustellen. Abbildung **F** zeigt ein GbsR-Monomer, bei dem die beiden Tryptophane, welche für die Messung der Cholinbindung verantwortlich sind, hervorgehoben wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei dem postulierten Helix-Turn-Helix-Motiv in GbsR aus *B. subtilis* tatsächlich um ein DNA-Bindemotiv handelt, da sich dieses ebenfalls wie in Mj223 aus *M. jannaschii* am N-Terminus befindet und somit Teil der DNA-Bindedomäne ist.



## V. Diskussion

Die Wasserverfügbarkeit eines Habitats ist für Mikroorganismen eines der wichtigsten Parameter für Wachstum und Vermehrung und somit für das Überleben in ihrem speziellen Lebensraum. Da sie oft Schwankungen unterliegen und die Mikroorganismen keine Möglichkeit haben, Wasser aktiv über die Zellmembran aus der Zelle heraus oder in die Zelle hinein zu transportieren, ist eine aktive Anpassungsfähigkeit der Mikroorganismen an schwankende Osmolaritäten essentiell. Zur Tolerierung von hyperosmotischen Bedingungen erfolgt eine Akkumulation von kompatiblen Soluten, eine Gruppe kleiner organischer Moleküle, die osmotisch aktiv sind und auch in molaren Konzentrationen keine negativen Einflüsse auf zelluläre Komponenten und den Zellstoffwechsel haben. Diese Anhäufung erfolgt präferentiell durch die Aufnahme vorgefertigter kompatibler Solute oder deren Vorläufer aus der Umgebung. Sind im umgebenden Medium keine solche Substanzen vorhanden, so greift die Zelle auf Akkumulation endogen *de novo* synthetisierter, kompatibler Solute zurück (Kempf & Bremer, 1998; Bremer & Krämer, 2000; Holtmann *et al.*, 2004). Die Akkumulation kompatibler Solute als osmotische Stressantwort ist nicht nur bei Bakterien, sondern in allen Domänen des Lebens verbreitet (Roberts, 2005; Burg & Ferraris, 2008).

In dieser Arbeit wurde die Adaptation an hyperosmotische Bedingungen in dem Gram-positiven Bodenorganismus *Bacillus subtilis* untersucht. *B. subtilis* ist in der Lage, ein breites Spektrum an kompatiblen Soluten aus dem Boden aufzunehmen, während er nur Prolin *de novo* synthetisieren kann (Bremer, 2002). Allerdings ist *B. subtilis* in der Lage aus der Vorstufe Cholin, das er aus dem Boden aufnehmen kann, über eine zweistufige Oxidationsreaktion das kompatiblen Solut Glycin Betain zu synthetisieren (Boch *et al.*, 1996). Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl die Regulation der Glycin Betain Synthese als auch die Regulation der Aufnahme von Cholin durch den GbsR Repressor, ein intrazellulärer Cholinsensor, genetisch und molekular näher untersucht.

### 1. Die Regulation der Glycin Betain Synthese

Glycin Betain wird häufig als Osmoprotektivum in Bakterien, Pflanzen, Tieren und auch menschlichen Zellen genutzt (Csonka & Epstein, 1996; Kempf & Krämer, 1998; McNeil *et al.*, 1999; Burg & Ferraris, 2008). Einige Mikroorganismen, wie halophile und halotolerante phototrophe Cyanobakterien (Reed *et al.*, 1986; Sibley & Yopp, 1987) und halophile *Archaea*

(Lai *et al.*, 1999; Nyssola *et al.*, 2000) sind in der Lage Glycin Betain bei Salzstress *de novo* zu synthetisieren. Dabei wird die Aminosäure Glycin in einer dreistufigen Methylierungsreaktion zu Glycin Betain umgewandelt. Als Zwischenprodukte erhält man Sarcosin und Dimethylglycin (Nyssola *et al.*, 2000). S-Adenosyl-Methionin fungiert dabei als Methyl-Gruppen-Donor (Galinski & Trüper, 1994). Es werden für die Regeneration einer aktiven Methylgruppe des S-Adenosyl-Methionins zwölf ATP Äquivalente verbraucht (Atkinson, 1977), d.h. für die Neusynthese von Glycin Betain werden insgesamt 36 Moleküle ATP verbraucht. Da der energetische Aufwand dieser Glycin Betain Synthese sehr hoch ist, ist diese *de novo* Synthese unter den heterotrophen Bakterien wenig verbreitet. Der am häufigsten verwendete Biosyntheseweg von Glycin Betain in Prokaryoten und Eukaryoten, ist die weniger energieaufwendige enzymatische Oxidation von Cholin zu Glycin Betain. *B. subtilis* gehört in diese zuletzt genannte Gruppe von Glycin Betain Produzenten. Mit einem Energieaufwand von nur zwei ATP für den Transport von Cholin in die Zelle, ist dieser in der Lage Glycin Betain zu synthetisieren. Dieser Biosyntheseweg von Cholin zu Glycin Betain ist auf molekularer Ebene für den Gram-negativen Modellorganismus *E. coli* (Lamark *et al.*, 1996) und den Gram-positiven Modellorganismus *B. subtilis* (Boch *et al.*, 1996; Kappes *et al.*, 1999) charakterisiert. Im Folgenden wird auf beide Mikroorganismen eingegangen.

### 1.1 Regulation der Glycin Betain Synthese in *E. coli*

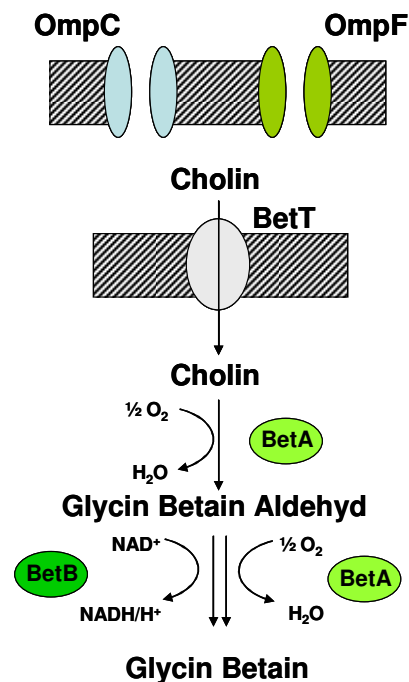
Der Mikroorganismus *E. coli* ist nicht in der Lage Glycin Betain als Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle zu nutzen (Landfald & Strøm, 1986). Glycin Betain dient ausschließlich zum Schutz bei hochosmolaren Wachstumsbedingungen. Die Glycin Betain Synthese aus dem Vorläufermolekül Cholin und ihre Regulation ist in dem Gram-negativen Organismus *E. coli* gut untersucht. Die Gene für die Cholinoxidase (BetA), welche sowohl Cholin zu Glycin Betain Aldehyd, als auch Glycin Betain Aldehyd zu Glycin Betain oxidieren kann, und für die Glycin Betain Aldehyd Dehydrogenase, welche den Aldehyd zu Glycin Betain weiteroxidiert, liegen zusammen mit dem Gen *betI*, dem Gen für das Regulatorprotein BetI in einem Operon. BetT, ein Cholin-Transporter, der von dem Strukturgen *betT* codiert wird, ist vor dem *betIAB*-Operon lokalisiert und wird in entgegengesetzter Richtung transkribiert (Lamark *et al.*, 1991). Die Cholinoxidase BetA benötigt für die Umsetzung von Cholin Sauerstoff als Elektronenakzeptor. Demnach kann *E. coli* nur unter aeroben Bedingungen Glycin Betain aus Cholin synthetisieren. Unter anaeroben Bedingungen werden die *bet*-Gene durch die Bindung des ArcA-Proteins an deren Promotorregion reprimiert (Lamark *et al.*, 1996). Eine volle

Expression des *bet*-Operons ist nur unter aeroben Wachstumsbedingungen in Anwesenheit von Cholin und unter erhöhter Osmolarität möglich. Glycin Betain, das Endprodukt der Synthese hingegen reprimiert die Cholininduktion des *betIAB*-Genclusters. Die Repression der Cholininduktion ist dabei spezifisch für Glycin Betain (Eshoo, 1988). BetI, das Regulatorprotein, mit einem Helix-Turn-Helix-Motiv am N-Terminus und einer Molekülmasse von 21,8 kDa, zeigt einige Homologien zu den Repressoren der TetR-Familie. BetI ist ein Cholin-Sensor und reguliert die Cholininduktion des *betIAB*-Operons *in vivo*. Durch Experimente mit *betI*-Mutanten konnte gezeigt werden, dass BetI die Expression der *bet*-Gene negativ reguliert (Lamark *et al.*, 1996). Regulatorgene sind oftmals autoreguliert und haben divergent überlappende Promotoren mit den Genen, die sie kontrollieren. Einen solchen überlappenden Promotor wurde für das *bet*-Regulon gefunden. BetI wird allerdings bei der Regulation eine für Repressoren ungewöhnliche Rolle zugeschrieben, denn BetI bindet sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit des Induktors Cholin *in vitro* an die Operatorstelle (Røkenes *et al.*, 1996). Den bisherigen Daten nach ist BetI allerdings nicht an der osmotischen Induktion des *bet*-Operons beteiligt (Lamark *et al.*, 1996).

A



B



**Abbildung 43: Aufnahme und Oxidation von Cholin zu Glycin Betain in *E. coli*.**

(A) Dargestellt ist die Organisation des *bet*-Regulons aus *E. coli*. In (B) ist der Aufnahmeweg und die Oxidation von Cholin zu Glycin Betain in *E. coli* aufgezeigt.

## 1.2 Regulation der Glycin Betain Synthese in *B. subtilis*

Auch im Gram-positiven Modellorganismus *B. subtilis* ist der Syntheseweg von Glycin Betain aus der Vorstufe Cholin auf physiologischer Ebene gut untersucht. *B. subtilis* ist ebenfalls wie *E. coli* nicht in der Lage Glycin Betain zu metabolisieren, sondern nutzt diese Substanz ausschließlich für osmotische Schutzfunktionen (Boch *et al.*, 1994). Da *B. subtilis* Cholin nicht *de novo* synthetisieren kann, muss Cholin aus der Umwelt aufgenommen werden. Dies erfolgt über die beiden ABC-Transporter OpuB und OpuC (Kappes *et al.*, 1999; Kempf & Bremer, 1998). Wie schon erwähnt, kann OpuC das größte Spektrum an Substraten aufnehmen (Bremer & Krämer, 2000) und besitzt eine gute Affinität zu Cholin ( $K_m = 38 \mu\text{M}$ ). OpuB, auch ein Bindeprotein-abhängiges Transportsystem, hingegen ist für die hochaffine Aufnahme von Cholin ( $K_m = 1 \mu\text{M}$ ) aus dem Medium verantwortlich (Kappes *et al.*, 1999). Die Oxidation von Cholin zu Glycin Betain erfolgt durch die Alkoholdehydrogenase GbsB und die Glycin Betain Aldehyd Dehydrogenase GbsA (Boch *et al.*, 1996). In *B. subtilis* sind die Gene der Enzyme, die für die Glycin Betain Synthese verantwortlich sind in einem Operon angeordnet (Boch *et al.*, 1996). Anders als in *E. coli* liegen die Gene für die Cholin-Transporter OpuB und OpuC nicht in der Nähe des Glycin Betain Synthese-Operons (*gbsAB*). Aus früheren Arbeiten (Boch *et al.*, 1996; Nau-Wagner, 1999) war bekannt, dass das *gbsAB*-Operon durch Cholin induzierbar ist. Eine weitere Induktion durch Salz, wie in *E. coli*, konnte aber für das *gbsAB*-Operon nicht festgestellt werden (Boch *et al.*, 1996). In dieser Arbeit konnten diese früheren Ergebnisse untermauert und weiter vertieft werden.

### 1.2.1 GbsR reguliert die Gene für die Aufnahme von Cholin durch den ABC-Transporter OpuB und vermittelt die Cholininduktion des *gbsAB*-Operons

Die beiden Aufnahmesysteme für Cholin, OpuB und OpuC, sind osmotisch induzierbar. Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden (Abb. 27, 28). Allerdings hat das Ausschalten des *gbsR*-Gens nur einen Einfluss auf die *opuB*-Expression. Durch die Ausschaltung von GbsR erhöht sich die Expressionsrate von *opuB* deutlich (Abb. 27). Somit ist gezeigt, dass GbsR die Expressionsrate des Cholin-Aufnahmesystems OpuB vermittelt. OpuC hingegen wird nicht durch GbsR kontrolliert (Abb. 28). Dies macht physiologisch Sinn, da OpuC ein breites Spektrum an Osmoprotektiva, unter anderem auch Cholin, transportieren kann, während OpuB nur die Aufnahme von Cholin vermittelt. Da trotz des Ausschaltens von GbsR die zusätzliche osmotische Induzierbarkeit von OpuB erhalten bleibt, ist gezeigt, dass

GbsR nicht für die Osmoregulation von OpuB verantwortlich ist. Frühere Ergebnisse und auch Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Induktion des *gbsAB*-Operons durch Cholin (Abb. 14), aber nicht durch hohe Osmolarität induziert werden kann. Wird jedoch Cholin in Verbindung mit hoher Osmolarität eingesetzt, führt dies zu einer Steigerung der Expressionsrate des *gbsAB*-Operons (Abb. 14). Es konnte gezeigt werden, dass sich z.B. bei Anwesenheit von hohen Salzkonzentrationen die Transportrate des Transporters OpuB verfünffacht (Nau-Wagner, 1999). Das heißt, dass die osmotische Kontrolle von *opuB* und *opuC* somit einen verstärkten Eintritt von Cholin in die Zelle erlaubt und dadurch die Expressionsrate des *gbsAB*-Operons erhöht wird. Somit wird die *gbsAB*-Expression durch die Verfügbarkeit von Cholin kontrolliert.

In vorherigen Untersuchungen und in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass GbsR, dessen Gen sich stromaufwärts des *gbsAB*-Operons befindet, als Repressor die Cholin-Kontrolle vermittelt. Schaltet man das *gbsR*-Gen aus, so erfolgt die Expression des *gbsAB*-Operons konstitutiv (Abb. 17). Das *gbsAB*-Operon ist dann nicht mehr durch Cholin induzierbar. In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass schon geringe Mengen an Cholin, nämlich 25 µM, ausreichen um das *gbsAB*-Operon zu induzieren (Abb. 16). Dies macht auch Sinn, denn in der natürlichen Umgebung von *B. subtilis* sind nur geringe Mengen an Cholin vorhanden (Boch *et al.*, 1996). Unterbindet man die Oxidation von Cholin zu Glycin Betain, führt dies zu einer Akkumulation von Cholin. Der Induktor kann in einen  $\Delta$ *gbsAB*-Stamm zwar noch an GbsR binden, wird aber nicht mehr zu Glycin Betain umgesetzt. In diesem Fall kommt es ebenfalls zu einer hohen Expression des *gbsAB*-Operons. Die erhaltenen Werte sind dabei vergleichbar mit denen eines Stammes, der eine *gbsR*-Deletion trägt. Es konnte ebenfalls untermauert werden, dass das Endprodukt der Synthese Glycin Betain nicht in der Lage ist, die Expression des *gbsAB*-Operons zu induzieren (Abb.15).

### 1.2.2 GbsR ist ein Repressorprotein mit einer Cholin-Bindedomäne

Alle Organismen antworten auf wechselnde Bedingungen in ihrer Umgebung durch die Kontrolle der Expression ihrer Gene. Transkriptionelle Regulation ist einer der effektivsten Wege um Enzymkonzentrationen anzupassen (Lewis, 2005). Sowohl in Prokaryoten, als auch in Eukaryoten ist die Transkription häufig durch Repressoren und Aktivatoren kontrolliert. Diese kontrollieren direkt oder indirekt entweder die Akkumulation, oder die Abnahme eines

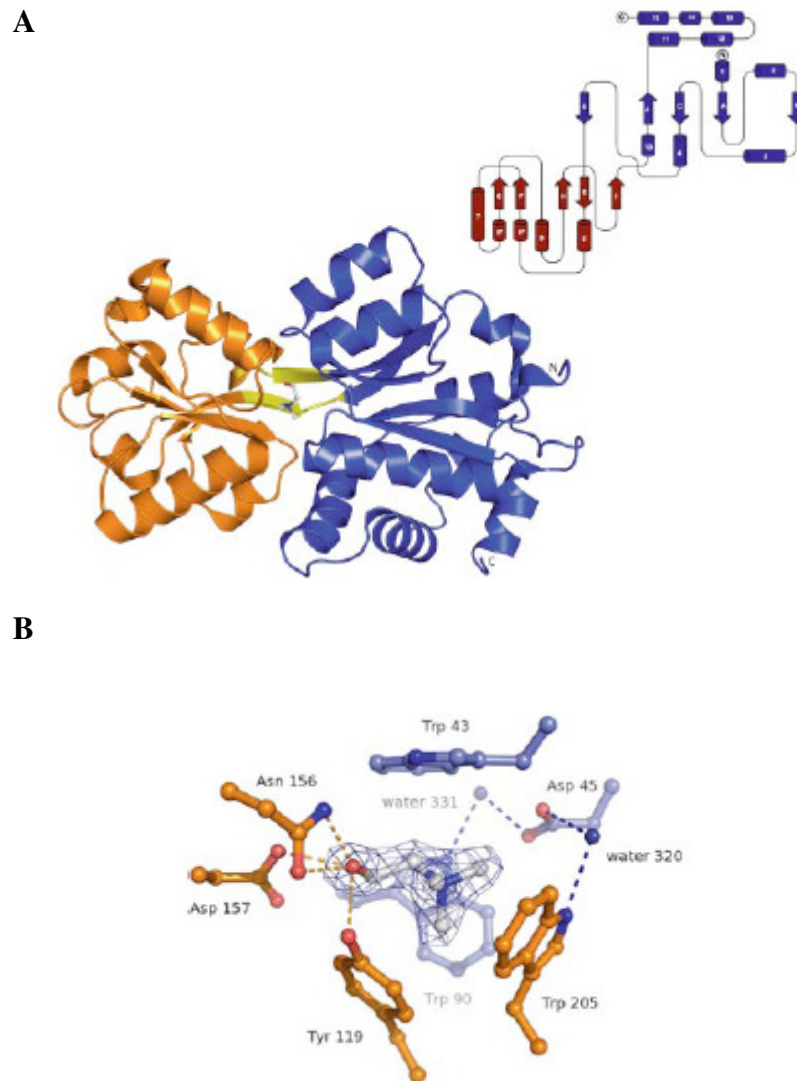
Metaboliten. Regulatoren antworten wie ein molekularer Schalter, die die Transkription an- oder ausschalten (Daber *et al.*, 2007). Die meisten transkriptionellen Regulatoren besitzen neben einer DNA-bindenden Domäne eine Bindedomäne für Effektoren. Effektormoleküle sind chemische Signale, die das metabolische Gleichgewicht der genetischen Maschinerie der Zelle fördern. Für die Glycin Betain Synthese ist Cholin das wichtige Molekül.

Dass es sich bei GbsR um einen intrazellulären Cholinsensor handelt, konnte in dieser Arbeit erstmals durch fluoreszenzspektroskopische Messungen gezeigt werden (Abb. 33). Mit dieser Methode wird die Fluoreszenzintensität der im Protein vorhandenen Tryptophane spektroskopisch bestimmt. Hier basiert die Messung auf zwei im GbsR-Protein vorhandenen Tryptophanen. Durch Bindung des Liganden an das Protein kommt es zu einer Konformationsänderung und somit auch zu einer Änderung der Fluoreszenzintensität. Durch diese Methode konnte eine direkte Bindung der Trimethylammonium-Verbindung Cholin durch GbsR nachgewiesen werden. Cholin bindet mit einer  $K_D$  von  $165 \mu\text{M} \pm 15 \mu\text{M}$  an den Repressor. Um die Frage, wie Cholin an den Repressor bindet, zu beantworten, wurde die Bindung von Cholin durch das Substratbindeprotein ChoX näher betrachtet.

Kristallstrukturen des Substrat-Bindeproteins ChoX aus *Sinorhizobium meliloti* (Oswald *et al.*, 2008) zeigen erstmals, wie Cholin gebunden wird. Der Ligand Cholin bindet in einer tiefen Furche zwischen den beiden globulären Domänen von ChoX (Abb. 44). Eine genaue Betrachtung der Bindeseite deutet darauf hin, dass sowohl Reste von der Domäne I als auch Reste der Domäne II eine aromatische Box, bestehend aus drei Tryptophanen und einem Tyrosin ausbilden. Dabei handelt es sich um Trp<sup>43</sup> (N-terminal von Helix 2 aus Domäne I), Trp<sup>90</sup> ( $\beta$ -Faltblatt C aus Domäne I), Trp<sup>205</sup> ( $\beta$ -Faltblatt H aus Domäne II) und Tyr<sup>119</sup> ( $\beta$ -Faltblatt E, am N-Terminus von Domäne II). Zusammen koordinieren diese vier aromatischen Seitenketten die Positionierung der Trimethylammonium-Kopfgruppe von Cholin in der Liganden-Bindetasche. Innerhalb der Kopfgruppe von Cholin ist die positive Ladung nicht auf das Stickstoffatom von Cholin fixiert, sondern über die drei Methylgruppen delokalisiert. Das hat ein voluminöses Kation zur Folge (Schiefner *et al.*, 2004). Die Bindung dieses großen Kations innerhalb der aromatischen Liganden-Bindebox erfolgt über Kation- $\pi$ - Interaktionen (Dougherty, 1996; Ma & Dougherty, 1997). Die Cholin-Kopfgruppe interagiert durch Kation- $\pi$ - Interaktionen mit den Resten, welche von beiden Domänen (I und II) von ChoX beigesteuert werden. Der Rest des Cholinmoleküls, eine Hydroxylgruppe, wird nur von Resten der Domäne II gebunden (Wasserstoffbrücke zu Asn<sup>156</sup> und Asp<sup>157</sup>).

Die Architektur der Liganden-Bindeseite aus ChoX zeigt Ähnlichkeiten zu den Glycin Betain Bindeproteinen, wie z.B. OpuA aus *B. subtilis* (Smits, *et al.*, 2008). Die Trimethylammonium-

Kopfgruppe von Glycin Betain weist eine ähnliche delokalisierte positive Ladung wie bei Cholin auf. Folglich spielen Kation- $\pi$ -Interaktionen auch bei der Bindung von Glycin Betain eine wesentliche Rolle.



**Abbildung 44: Kristallstruktur von ChoX aus *S. meliloti*.**

Abbildung (A) zeigt die komplette Struktur des ChoX-Cholin-Komplexes. Die Domänen sind farblich unterschieden. Domäne I ist blau, Domäne II ist orange dargestellt. Der Linker, der beide Domänen verbindet ist gelb markiert. Abbildung (B) zeigt die Cholin-Bindebox, Reste der Domäne I und II, die die Liganden-Bindeseite formen, sind in den Farben blau und orange dargestellt. Cholin ist in beiden Abbildungen in einer *ball-and stick*-Darstellung gezeigt. Diese Abbildungen sind entnommen aus Oswald *et al.*(2008).

In GbsR gibt es eine große Anzahl von aromatischen Aminosäuren. GbsR besitzt in seiner Aminosäuresequenz zwei Tryptophane, die durch ihre äußere Lage die flourenzenspektroskopische Messung ermöglichen, und sechs Tyrosine, zudem noch 11

Phenylalanine (Abb. 45). Da auch GbsR ein Cholin-bindendes Protein ist, ist anzunehmen, dass auch hier die Cholin-Bindung durch Kation- $\pi$ -Interaktionen mit einer aromatischen Bindebox stattfindet. Betrachtet man ein Sequenzvergleich von GbsR innerhalb der *Bacillen* und *Stapylococcen*, so fällt auf, dass die meisten dieser Aromaten konserviert sind (Anhang F). Um aber detaillierte Aussagen über eine mögliche Bindebox für Cholin machen zu können, sind Kristallstrukturen von GbsR nötig.

1	MDENPEFAAI	EQARDLVIDS	IAETMDLYGI	TRSVGILYGT	MYMRDEMTLD
51	EMREELQMSK	PSMSTGVKKL	QDLNVVKKTF	HRGIRKHTFV	AEKDFFKFFT
101	NFFPPKWERE	VQVNVTAEIE	AQADLQKVLG	KEDLDEDIKN	EALQLYDQLE
151	SSKAYYDNLK	RLAESVQTGE	IFKFIPVETK		

<span style="background-color: yellow; border: 1px solid black; padding: 0 5px;"> </span> Phe	<span style="background-color: pink; border: 1px solid black; padding: 0 5px;"> </span> Tyr	<span style="background-color: green; border: 1px solid black; padding: 0 5px;"> </span> Trp
---	---	--

**Abbildung 45: Sequenz von GbsR mit den eingezeichneten aromatischen Aminosäuren Phe, Tyr und Trp.** Eingezeichnet sind die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (gelb), Tyrosin (pink) und Tryptophan (grün).

### 1.2.3 GbsR ist ein transkriptioneller Repressor

Typische Repressorproteine zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, DNA an spezifischen Abschnitten zu binden. Eine solche typische DNA-Bindung konnte in dieser Arbeit auch für GbsR gezeigt werden (Abb. 25). Hierfür wurde das *gbsR*-Gen in einen Expressionsvektor kloniert und überexprimiert. Mit dem gereinigten Protein wurden anschließend Bandshift-Analysen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass GbsR nicht nur spezifisch an eine bestimmte DNA-Sequenz hinter dem Promotor von *gbsAB*, sondern auch spezifisch an die DNA der *opuB*-Promotorregion bindet. Um eine Vorstellung zu bekommen, wie GbsR an die DNA bindet, werden im Folgenden die Familie der Helix-turn-Helix-Proteine, sowie deren Unterklasse die Winged-Helix-Turn-Helix-Proteine, und das strukturell ähnliche Mj223-Protein aus *M. jannaschii* näher betrachtet.

Man klassifiziert DNA-Bindeproteine aufgrund ihrer Art DNA zu binden. Mitglieder der am besten untersuchten Klasse von DNA-Bindeproteinen bilden das Helix-Turn-Helix-Motiv aus, das ursprünglich in dem  $\lambda$ Cro-Protein identifiziert wurde. Erste Arbeiten von Matthews, Ohlendorf, Sauer, Doolittle und deren Mitarbeitern zeigten eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen den Repressoren Cro und cI des Phagen Lambda und LacI aus *E. coli*. Allen gemein ist eine tri-helicale DNA-Bindedomäne. Die zweite und dritte Helix der tri-helicalen Domäne, spielen eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit der DNA. Diese DNA-

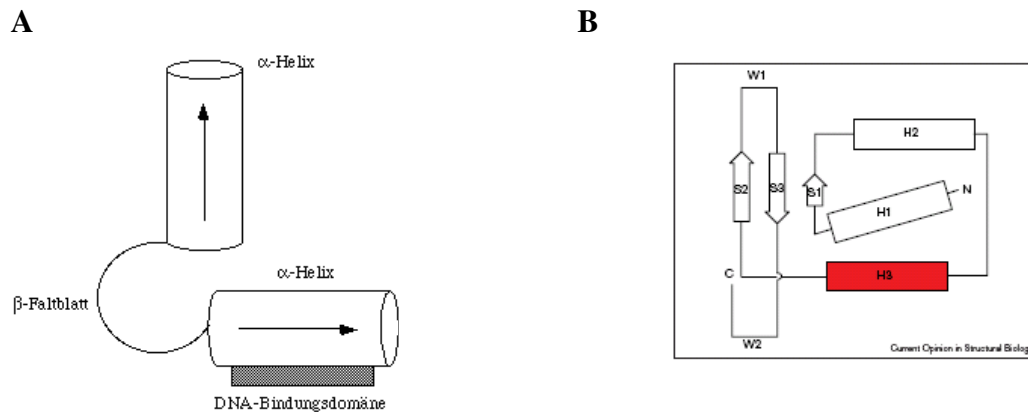


Bindedomäne wurde als Helix-Turn-Helix-Domäne bezeichnet (Aravind *et al.*, 2005). Dieses Strukturelement wurde in einer Vielzahl von DNA-bindenden Proteinen in Prokaryoten und Eukaryoten wieder gefunden und besitzt einen hohen strukturellen Konservierungsgrad. Die Aminosäuresequenz von GbsR weist keine eindeutigen Homologien zu bisher bekannten Familien von DNA-Bindeproteinen auf. Am N-Terminus der GbsR-Sequenz konnte allerdings eine Aminosäuresequenz entdeckt werden, die für die Ausbildung eines Helix-Turn-Helix-Motives in Frage kommt. In der vorhergegangenen Arbeit von Nau-Wagner (1999) wurde vermutet, dass GbsR vielleicht in die Gruppe von GntR-Regulatoren gehört. GntR ist der Transkriptionsrepressor des Gluconat-Operons *gntRKPZ* in *B. subtilis* (Fujita *et al.*, 1986). Alle Regulatoren innerhalb dieser Familie besitzen eine N-terminale Aminosäuresequenz, die sie zur Ausbildung eines Helix-Turn-Helix-Motivs befähigt. Die Sequenz von GbsR weicht allerdings an einigen Stellen von der Konsensussequenz für Regulatoren der GntR-Familie ab. Auch die Vermutung aus der Arbeit von Nau-Wagner (1999), dass GbsR vielleicht in die Familie der LysR-Regulatoren gehört, konnte nicht bestätigt werden. Die meisten Regulatoren der LysR-Familie regulieren ihre Zielgene positiv (Schell, 1993), in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei GbsR allerdings um einen negativen Regulator handelt. GbsR kann auch heute keiner bisher bekannten Regulatorfamilie zugeordnet werden.

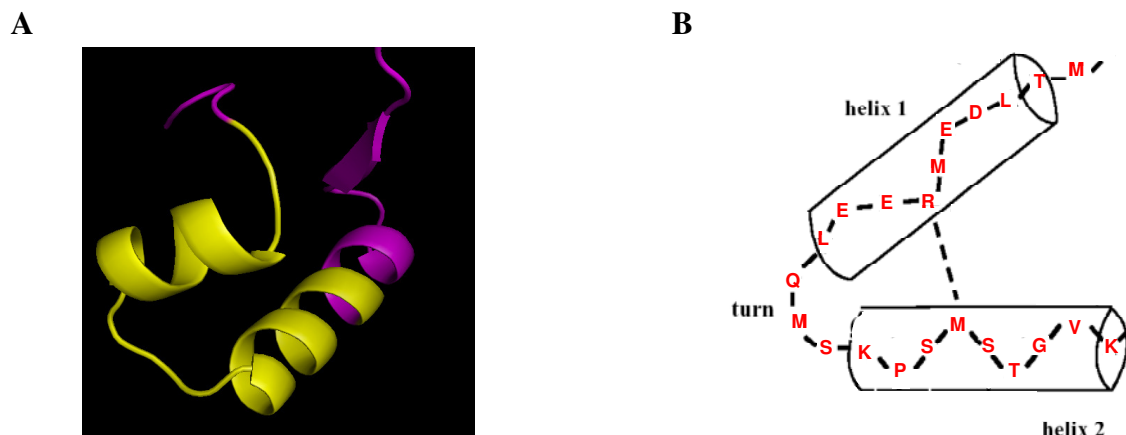
Bakterielle HTH- Transkriptionsfaktoren können in Repressoren und Aktivatoren eingeteilt werden, da sie sich strukturell unterscheiden. Solche, die ein HTH-Motiv am N-Terminus zeigen, sind meistens Repressoren und bei denen, die dieses Motiv am C-Terminus haben, handelt es sich üblicherweise um Aktivatoren (Perez-Rueda & Collado-Vides, 2001). Die einfachste Form des Helix-Turn-Helix Motives besteht aus zwei alpha-Helices, welche durch eine  $\beta$ -Faltblattstruktur voneinander getrennt sind. Der „turn“ besteht aus drei Aminosäuren (Wintjens & Rooman, 1996). Dabei beteiligt sich die  $\beta$ -Schleife nicht an der DNA-Bindung, sondern unterstützt die Bildung von Homo- bzw. Heterodimeren. Die kurze und flexible  $\beta$ -Schleife dient als Scharnier und ermöglicht es den Helices, gegenseitige hydrophobe Wechselwirkungen einzugehen. Dadurch werden die Helices relativ zueinander stabilisiert und bilden ein Tertiärstrukturelement (Wintjens & Rooman, 1996). Die zweite Helix im HTH Motiv ist die „Sequenzerkennungshelix“ und tritt über elektrostatische Wechselwirkungen mit den Basen der großen Furche der Ziel-DNA in Kontakt. Die erste helikale Domäne liegt der zweiten senkrecht gegenüber und stellt den Kontakt zu der DNA über unspezifische Wechselwirkungen her (Pabo & Sauer, 1984) (Abb. 46). Der Winkel zwischen den Helices liegt in der Regel bei 120° (Brennan & Matthews, 1989).

GbsR besitzt eine mögliche Sequenz für das HTH-Motiv am N-Terminus (Abb. 36), somit kann es auch strukturell und in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit vorgelegten genetischen Daten in die Klasse der Repressoren eingeordnet werden. Die Aminosäuresequenz von GbsR zeigt eine Identität von 34 % zu Mj223, einem DNA-Bindeprotein aus *Methanococcus jannaschii* (Kapitel IV.5.3, Abb. 40). Dieses DNA-Bindeprotein trägt ein N-terminales Winged-Helix-Turn-Helix-Motiv. Winged Helix Proteine sind eine Unterfamilie der Helix-Turn-Helix Proteine. Dieses Motiv wurde erstmals 1993 in dem hepatocyte nuclear factor-3 (HNF-3), einer Familie von leberspezifischen Transkriptionsfaktoren, entdeckt. Diese Familie teilt sich eine hochkonservierte DNA-Binderegion mit dem Drosophila homeotic fork head Protein. Das Winged Helix Motiv ist eine kompakte  $\alpha/\beta$ -Struktur, die aus zwei „Flügeln“ (W1 und W2), drei  $\alpha$ -Helices (H1, H2 und H3) und drei  $\beta$ -Faltblättern (S1, S2 und S3) besteht, welche wie folgt angeordnet sind: H1-S1-H2-H3-S2-W1-S3-W2 (Gajiwala & Burly, 2000).

Der N-Terminus ist weitgehend helikal, während der C-Terminus sich zum einen aus zwei der drei Stränge, die eine antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt bilden, und zum anderen aus den beiden langen Schleifen, bzw. Flügeln W1 und W2 zusammensetzt. Flügel W1 verbindet die beiden Stränge S2 und S3 und W2 erstreckt sich vom Strang S3 bis zum C-Terminus der DNA-Bindedomäne (siehe Abb. 46 B). Diese Schleifen flankieren Helix H3 wie die Flügel eines Schmetterlings, was diesem Motiv den Namen „winged helix“ gab. Unter den Winged Helix Proteinen variieren die Winkel zwischen H2 und H3 von  $100^\circ$  (z.B. BirA (Wilson *et al.*, 1992)) bis  $150^\circ$  (Transkriptionsfaktor DP2 (Zheng *et al.*, 1999)). Es konnte für das HNF-3 $\gamma$  Protein, und für die Transkriptionsfaktoren genesis, E2F4 und DP2 gezeigt werden, dass die Helix H3 die „Erkennungshelix“ im HTH-Motiv ist und spezifische Kontakte mit der DNA in der großen Furche eingeht (Clark *et al.*, 1993; Gajiwala *et al.*, 2000). Die DNA-Bindedomäne des hRFX1 Proteins, bedient sich einem anderen Mechanismus in der DNA-Erkennung. Die  $\beta$ -Stränge S2 und S3 und deren Verbindungsglied W1 machen intensive Kontakte mit der großen Furche. Eine Seitengruppe der alpha-Helix H3 interagiert mit der kleinen Furche (Gajiwala *et al.*, 2000). Die Winged-Helix Proteine zeigen also verschiedene Art und Weisen der DNA-Bindung und scheinen in der Lage zu sein, sowohl spezifische Sequenzen in der B-DNA, als auch in den verschiedenen doppelhelikalen Konformationen, wie z.B. B-Form gegen Z-Form, erkennen zu können. Des Weiteren ist bekannt, dass diese Proteine sowohl als Monomere, Heterodimere und als Homodimere an die DNA binden können (Gajiwala & Burly, 2000).



**Abbildung 46: Helix-Turn-Helix-Motiv (A) und die Topologie der Winged Helix Faltung (B) (Gajiwala & Buley, 2000).** (A) Diese Motiv ist eine Anordnung von zwei  $\alpha$ -Helices, von denen eine an die DNA bindet, während die andere Protein-Protein-Wechselwirkungen eingeht.

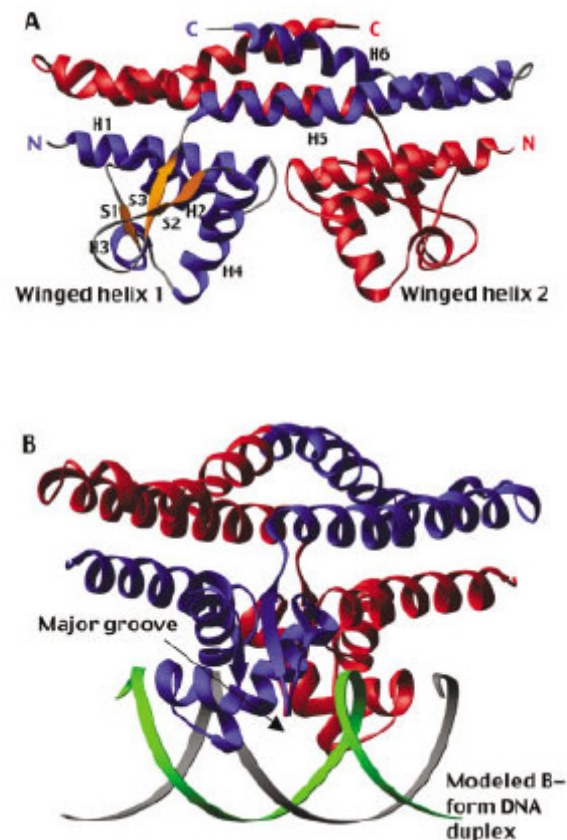


**Abbildung 47: Modell des Helix-Turn-Helix-Motives von GbsR**

Abbildung A zeigt einen Ausschnitt des mit Hilfe der Kristallstruktur von Mj223 über die Internetseite <http://swissmodel.expasy.org> entwickelte Modell für GbsR. Das mit Hilfe des Analyseprogrammes von Dodd & Egan ermittelte Helix-Turn-Helix-Motiv ist gelb markiert. In (B) ist das HTH-Motiv von GbsR schematisch dargestellt.

Zudem kann das Mj223-Protein aus *Methanococcus jannaschii* der Familie der ArsR-Proteine zugeordnet werden. Bei der ArsR-Familie handelt es sich um metallregulierte Transkriptionsrepressoren. ArsR-Proteine sind involviert in Metallstress und fungieren in der Form von einem Homodimer als Metallsensor (Busenlehner *et al.*, 2003). Die C-terminale Region dieses Proteins setzt sich aus zwei leucinreichen  $\alpha$ -Helices zusammen, welche für die Dimerisierung verantwortlich sind. Die sekundäre Struktur hat folgende Anordnung: H1-H2-S1-H3-H4-S2-S3-H5-H6, dabei steht H für alpha-Helix und S für  $\beta$ -Faltblatt (Ray *et al.*, 2003). Strukturanalysen mit dem MRCL Programm, welche auch für GbsR durchgeführt

wurden (Kapitel IV.5.1, Abb. 35) zeigen eine sehr ähnliche Vorhersage der Sekundärstruktur (Kapitel IV.5.3, Abb. 41). Somit kann man vermuten, dass eine solche Anordnung auch für GbsR möglich wäre. Es wird angenommen, dass das Mj223-Dimer ein symmetrisches Paar von Halbseiten durch die alpha-Helices H4 und H4' (H4' steht für das zweite Monomer) in der großen Furche der B-DNA-Doppelhelix gebunden wird. Dabei kommt es zu starken Änderungen der Struktur (Abb. 48 B)



**Abbildung 48: Mj223 Homodimer Struktur.**

Bild A zeigt die Homodimer Struktur des Mj223 Proteins aus *Methanococcus jannaschii*, blau sind die  $\alpha$ -Helices und orange sind die  $\beta$ -Faltblätter in einem Monomer dargestellt, das zweite Monomer ist rot gefärbt. B zeigt ein Modell für die mögliche Bindung dieses Proteins an die B-DNA (Ray *et al.*, 2003).

Mit Hilfe der Kristallstruktur von Mj223 ließ sich über die Internetseite <http://swissmodel.expasy.org> ein Modell für GbsR entwickeln. Bei einem Übereinanderlegen der Mj223-Struktur mit dem GbsR-Modell (Abb. 42 E) sind nur wenige Abweichungen festzustellen, vor allem die DNA-Binderegion zeigt eine große Homologie. Somit ist auch für GbsR denkbar, dass dieser Repressor auf diese Weise an die DNA bindet.

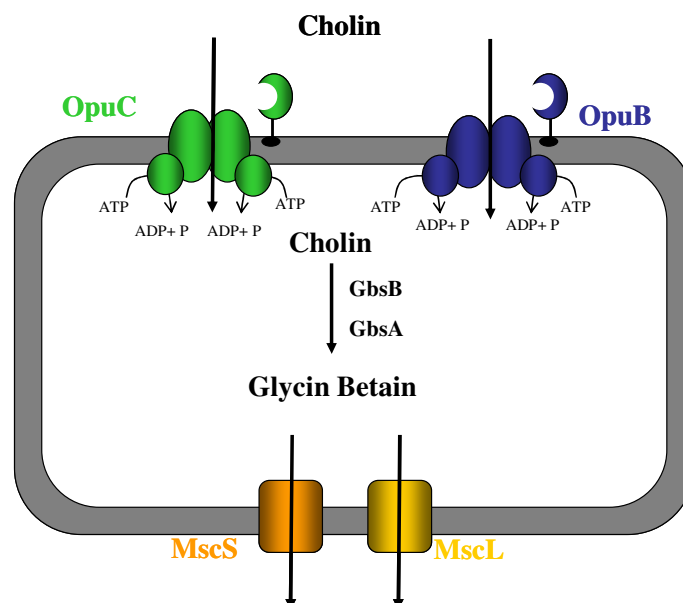
Die DNA-Bindung erfolgt spezifisch durch die Regulatorproteine, diese erkennen eine bestimmte Sequenz und gehen Wechselwirkungen mit der DNA ein. Dabei handelt es sich bei den Erkennungssequenzen oft um bestimmte Motive wie zum Beispiel Palindrome oder Inverted Repeats. Auch für GbsR konnte eine mögliche Operator-Sequenz identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um ein Inverted Repeat (Abb. 31). Da diese mögliche Bindebox sowohl im Bereich hinter dem Promotor von *gbsAB* als auch im Promotorbereich vor *opuB* zu finden ist, lässt sich vermuten dass es sich hierbei um die Bindestelle von GbsR handelt. Denn beide Zielgene werden durch GbsR reguliert. Dies wurde auch durch DNA-Bindestudien belegt. Bei den vermuteten Bindestellen für das Repressorprotein GbsR zeigt sich, dass diese bei *opuB* und *gbsAB* unterschiedlich lokalisiert sind und es sich demnach um unterschiedliche Mechanismen der Repression handelt. Bei *gbsAB* liegt die vermutete Bindestelle hinter dem *gbsAB*-Promotor. Dort nimmt GbsR die Funktion als „Road block“ ein, d.h. die RNA-Polymerase kann zwar an den Promotor binden, jedoch das Ablesen der Gene wird durch GbsR verhindert. Im Fall von *opuB* befindet sich die vermutete Bindestelle im Promotorbereich. Demnach kann die RNA-Polymerase nicht an den Promotor binden, da dieser durch GbsR blockiert wird. Weiterhin konnte das vermutete Bindemotiv in der *opuC*-Promotorregion nicht aufgefunden werden, was besagt, dass *OpuC* nicht durch GbsR reguliert wird. Diese Aussage deckt sich mit den *opuC-treA*-Fusionsexperimenten (Abb. 28) und mit der Bandshift-Analyse des *opuC*-Promotorbereiches. Betrachtet man sich die Promotorregion von *opuC* genauer, so wird deutlich, dass nur wenige Austausche an Basen dafür verantwortlich sind um einen Verlust der Regulation durch GbsR zu bekommen (Abb. 30). Würde man in weiteren Versuchen die *gbsAB*-spezifische DNA-Sequenz durch eine Mutagenese so verändern, dass sie der *opuC*-spezifischen DNA-Sequenz entspricht, so würde man einen Verlust der Kontrolle durch GbsR und somit auch keine DNA-Bindung mehr erwarten.

Um allerdings sicher zu gehen, dass es sich hierbei tatsächlich um die Bindestelle von GbsR handelt müssten noch weitere Experimente durchgeführt werden. So gäbe zum Beispiel eine DNA-Footprint-Analyse Aufschluss darüber, ob das identifizierte Motiv die Operator-DNA für GbsR ist.

#### **1.2.4 GbsR vermittelt die Repression des *gbsAB*-Operons durch Glycin Betain**

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass das Endprodukt der Cholinumsetzung, Glycin Betain, einen reprimierenden Effekt auf die Expression des *gbsAB*-Operons ausübt

(Abb. 19). Auch konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt spezifisch von Glycin Betain ausgeht und nicht ein Effekt eines kompatiblen Soluts ist (Abb. 20). Im Gegensatz zur Induktion des *gbsAB*-Operons, wo schon geringe Konzentrationen an Cholin ausreichen, zeigt sich ein reprimierender Effekt von Glycin Betain erst bei höheren Konzentrationen (Abb. 21). Dies würde man auch erwarten, da die Zelle unter osmotischem Stress Glycin Betain bis hin zu molaren Konzentrationen akkumuliert (Moses, 1999). Würde eine Repression der Synthese von Glycin Betain schon bei niedrigen Konzentrationen einsetzen, so wäre die Zelle nicht in der Lage Glycin Betain vermehrt zur Akkumulation zu synthetisieren. Auch bei einer unterbundenen Oxidation von Cholin zu Glycin Betain, kann die Expression des *gbsAB*-Operons durch Glycin Betain reprimiert werden (Tab. 16). Zudem konnte herausgefunden werden, dass GbsR nicht nur für die Vermittlung der Cholininduktion verantwortlich ist, auch die Repression des *gbsAB*-Operons wird durch GbsR vermittelt (Abb. 19, 20). Das Ausschalten des *gbsR*-Gens führt dazu, dass Glycin Betain keinen Effekt mehr auf die *gbsAB*-Expression ausübt (Tab. 17). Somit ist gezeigt, dass GbsR durch einen physiologisch wichtigen negativen Feedback-Loop des Syntheseproduktes Glycin Betain kontrolliert wird. Dies ist physiologisch wichtig, denn gäbe es diese Rückkopplung nicht, so wäre Folgendes denkbar: das im Medium vorhandene Cholin würde durch OpuB und OpuC in die Zelle aufgenommen werden und dort durch die Enzyme GbsA und GbsB zu Glycin Betain oxidiert werden. Die Glycin Betain Konzentration würde soweit ansteigen bis der Zellinnendruck so hoch wäre, dass sich die mechanosensitiven Kanäle öffnen. Durch diese würde dann das Glycin Betain aus der Zelle diffundieren (Abb. 49). Dieser Weg wäre für die Zelle weniger effizient.



**Abbildung 49: Ausschnitt *B. subtilis*- Zelle.** Dargestellt ist die Aufnahme von Cholin in die Zelle und die Umwandlung zu Glycin Betain, sowie der vermutete Austritt von Glycin Betain durch die mechanosensitiven Kanäle, wenn der GbsR-vermittelte Feedback-Loop durch Glycin Betain fehlen würde.

Aufgrund aller bisherigen Ergebnisse lässt sich ein Modell für die Regulation der Glycin Betain Synthese durch den Cholin-sensorischen GbsR-Repressor entwickeln (Abb. 50),

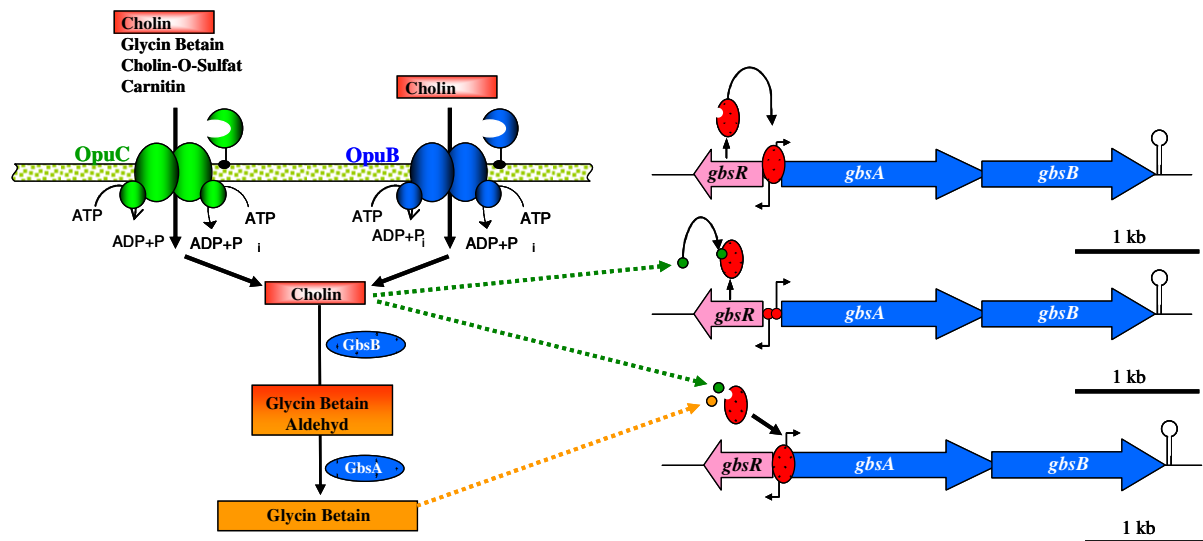


Abbildung 50: Modell der Regulation der Glycin Betain Synthese in *B. subtilis*

Das Modell in Abbildung 50 besagt, dass bei hochosmolaren Wachstumsbedingungen Cholin vermehrt in die Zelle transportiert wird. Cholin bindet an den Repressor GbsR, dieser löst sich von der DNA und die Transkription der Glycin Betain Synthese-Gene kann gestartet werden. Ist genügend Glycin Betain produziert worden, bzw. in der Zelle vorhanden, so übt das Endprodukt Glycin Betain einen negativen Feedback-Loop auf den Repressor GbsR aus. Dieser bindet nun wieder an die DNA und eine Überanhäufung des kompatiblen Sutes Glycin Betain wird verhindert. Allerdings ist noch nicht bekannt wie Glycin Betain die Kontrolle auf GbsR ausübt. Eine Bindung wie von Cholin konnte bei Glycin Betain nicht beobachtet werden. Auch bei Versuchen mit höheren Konzentration (bis zu 500 mM) an Glycin Betain konnte keine Fluoreszenzänderung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Es wird vermutet, dass durch die Bindung von Cholin eine Konformationsänderung des Repressors GbsR stattfindet, was dazu führt, dass sich dieser von der DNA löst. In Anwesenheit von großen Mengen an Glycin Betain muss dieser nun wieder an die DNA binden können. Hierzu können unterschiedliche Modellvorstellungen entwickelt werden. Zwei Modelle werden im Weiteren näher betrachtet.

#### **1.2.4.1 Glycin Betain bindet mit niedrigerer Affinität in kompetitiver Art mit Cholin an die Effektor-domäne von GbsR**

Regulatoren spielen als Schalter, die die Transkription von Genen an- und ausschalten eine große Rolle. Eine Zelle ist in der Lage effektiv den Stoffwechsel durch eine Erhöhung oder Erniedrigung der Enzymkonzentrationen zu regulieren. In *E. coli*, ist die Lactoseverwertung durch die Bindung des Repressors an die Operator-DNA negativ reguliert, d.h. die Expression der Strukturgene dieses Operons ist blockiert. Der Lac-Repressor ist ein Protein mit modularer Struktur, bestehend aus vier unterschiedlichen strukturellen Einheiten. Der N-terminale Teil der Sequenz (Rest1-49) beinhaltet das Helix-Turn-Helix-Motiv, eine Art Schanierhelix (Rest 50-58) verbindet Kopfstück mit dem Rest. Der Kern des Repressors (Rest 62-331) ist strukturell in zwei Domänen geteilt. An der Verbindung der beiden Domänen befindet sich die Effektor-Bindebox. Der C-Terminus des Repressors besteht aus einer alpha-Helix, welche für die Ausformung eines Tetramers verantwortlich ist (Daber *et al.*, 2007). In Anwesenheit des Induktors Allolaktose oder auch IPTG löst sich der Repressor von der DNA und die Expression der Strukturgene kann stattfinden. Ein Anti-Induktor für das *lac*-Operon stellt ONPF (2-methyl-6-(2-nitrophenoxy)oxane-3,4,5-triol) dar. Induktor- und Anti-Induktor-Moleküle ändern das Gleichgewicht zwischen dem induzierten und reprimierten Zustand. Durch den gebundenen Induktor, ist die Affinität des Repressors an die DNA zu binden sehr gering. Auf diese Weise wird der RNA-Polymerase ermöglicht an den Promotor zu binden und die Transkription zu starten. Der Anti-Induktor bindet ebenfalls an den Repressor und schaltet die Transkription ab, indem er die Stabilität des Repressor-DNA-Komplexes erhöht. Dies geschieht aufgrund von Konformationsänderungen des Repressors durch die Bindung der Liganden. Im Lac-Repressor binden Induktor und Anti-Induktor an derselben Stelle. Jedes Monomer besitzt eine Bindestelle. Die Effektormoleküle binden in der Tasche, die an der Kopplungsstelle des Kerns lokalisiert ist (Lewis, 2005). Die Effektormoleküle sind Galaktoside, die chemisch und strukturell verwandt sind. Allerdings binden diese Moleküle nicht in derselben Weise an den Repressor. Dies hat Änderungen in der DNA-Bindedomäne zur Folge. Man unterscheidet die induzierte und von der reprimierten Konformation. In Anwesenheit von IPTG kommt es zur Verschiebung der N-terminalen Subdomäne des Dimers, dies hat zur Folge, dass sich die Schanierhelix wegbewegt. Diese Wegbewegung zerstört die Dimerisierung der Helices und die Helices werden ungeordnet. Das HTH-Motiv bewegt sich aus der großen Furche von der DNA-Bindeseite weg. In Anwesenheit des Anti-Induktors ONPF hingegen, bleibt die Konformationsänderung aus, denn ONPF bindet zwar



an die Effektorstelle, aber es fehlen einige Interaktionen, somit ist die Affinität zur Operator-DNA wieder erhöht (Daber *et al.*, 2007)

Diese Art der allosterischen Regulation wäre auch für GbsR denkbar, denn auch hier sind sich die Effektormoleküle strukturell sehr ähnlich. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist Cholin das Induktormolekül und Glycin Betain das Effektormolekül, dass die Transkription der *gbsAB*-Gene reprimiert. Sowohl die Induktion, als auch die Repression des *gbsAB*-Operons wird durch GbsR vermittelt. Beide Effektormoleküle besitzen eine Tri-Methylammoniumgruppe, und es konnte gezeigt werden, dass Substratbindeproteine, wie z.B. das ChoX aus *S. meliloti*, sowohl Cholin als auch Glycin Betain binden können (Höing, 2008, Oswald *et al.*, 2008). Somit wäre denkbar, dass Glycin Betain an einer überlappenden Stelle wie Cholin im Repressor bindet. In dieser Arbeit konnte keine Bindung für Glycin Betain gezeigt werden, allerdings beruht die Messung auf der Fluoreszenzintensität der Tryptophane im Protein, welche durch Bewegungen des Proteins zu-oder abnehmen können. Durch die Bindung von Cholin war eine Intensitätsabnahme zu messen, was besagt, dass Cholin gebunden wird und das Protein eine Konformationsänderung macht. Verhält sich GbsR wie der bereits zuvor beschriebene Lac-Repressor, so kommt es durch die Zugabe des Anti-Induktors zu keiner Konformationsänderung, da diese Form der nativen DNA-bindenden Form entspricht. Somit kann mit Glycin Betain durch Fluoreszenzspektroskopie keine Bindung gemessen werden. Dies müsste auf eine andere Weise geschehen. Es müsste auf jeden Fall eine Reihe von weiteren Experimenten folgen, um zu klären wie Glycin Betain seine Wirkung entfaltet.

#### **1.2.4.2 Glycin Betain fungiert als chemisches Chaparon**

Exogen bereitgestellte Osmoprotektiva in einem hyperosmolaren Kulturmedium werden effizient in die gestresste Zelle importiert und dort akkumuliert. Außer ihrer klaren Rolle in der Regeneration und Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichtes, spielen diese Solute eine wichtige Rolle bei dem Verhalten von zellulären Makromolekülen, wie zum Beispiel dem Prozess der Proteinstabilisierung und Proteinfaltung (Ignatova & Gierasch, 2007). Durch eine chemische random-Mutagenese wurde eine Lysin auxotrophe Mutante erhalten (Bourot *et al.*, 2000). Die Mutation liegt in dem *lysA*-Gen und hat eine Substitution von Serin an der Position 384 durch Phenylalanin der Diaminopimelat Decarboxylase (DAPDC), welche die Umsetzung von *meso*-Diaminopimelat zu L-Lysin katalysiert, ergeben. Diese Mutation hat einen totalen Verlust der Enzym-Aktivität zur Folge, was den

Wachstumsverlust in Abwesenheit von Lysin im Wachstumsmedium erklärt. Eine Zugabe von Osmoprotektiva zum Medium, stellt das Wachstum dieser Mutante wieder her, was die Regenerierung der DAPDC-Aktivität zu erkennen gibt. Es konnte gezeigt werden, dass die Regenerierung der Aktivität der mutierten DAPDC proportional zur intrazellulären Verfügbarkeit von Glycin Betain ist. Diese Ergebnisse weisen auf eine *in vivo* Glycin Betain-unterstützte Rückfaltung des mutierten DAPDC hin (Bourot *et al.*, 2000). Glycin Betain ist ein Osmoprotektivum, das komplett von der Hydrathülle von Proteinen ausgeschlossen wird (Arakawa & Timasheff, 1985). Man dachte, dass dieser offensichtlich hohe Grad des Ausschlusses mit dem Einfluss als meist effektivstes Osmoprotektivum im Verhältnis steht. Die besagt, dass dieses störende Solut nicht an Stellen des Proteins binden kann (Record *et al.*, 1998). Eine Erhöhung der Osmolarität der Lösung reduziert signifikant die thermodynamische Aktivität von Wasser und dabei werden Prozesse begünstigt, in denen Hydratwasser von biopolymeren Oberflächen verdrängt wird (Record *et al.*, 1998). Die beobachtete Faltung des mutierten DAPDC-Proteins muss zwangsläufig Protein-Protein-Interaktionen begünstigen, ausgelöst von den Wasser-Protein-Interaktionen. Somit kann gefolgert werden, dass der Glycin Betain induzierte DAPDC-Faltungskomplex über eine thermodynamische Kraft angetrieben wird, da durch das Vorhandensein von Glycin Betain das ungefaltete-gefaltete-Gleichgewicht drastisch in Richtung der gefalteten Konformation gedrängt wird. Man kann sagen, dass Glycin Betain die Faltung des mutierten DAPDC-Proteins wie ein Chaparon fördert, aber höchstwahrscheinlich in einer anderen Art und Weise als es der klassische Chaparon-Komplex tut (Bourot *et al.*, 2000).

Auch dieses Modell der chaparon-ähnlichen Wirkung wäre für GbsR denkbar. In diesem Fall verhilft das gebildete Glycin Betain, welches nun genügend vorhanden ist, durch Änderung der Konformation, dem Repressor wieder an der DNA zu binden. Dabei ist die Rückfaltung des Repressors abhängig von der Konzentration an kompatiblen Solut. Allerdings ist dieses Modell nicht spezifisch für Glycin Betain, denn auch andere kompatible Solute wie Prolin und Ectoin können diesen Effekt ausüben. In der vorliegenden Arbeit konnte aber gezeigt werden, dass andere Osmoprotektiva wie Prolin und Ectoin keinen reprimierenden Einfluss auf die *gbsAB*-Expression haben. Dabei muss allerdings erwähnt werden, dass diese beiden kompatiblen Solute für *B. subtilis* schlechte Osmoprotektiva sind. Der Versuch muss auf weitere, für *B. subtilis* gute Osmoprotektiva erweitert werden. Carnitin hingegen konnte einen geringen reprimierenden Effekt aufweisen. Da Carnitin ebenfalls wie Cholin und Glycin Betain eine Trimethyl-Ammonium-Gruppe besitzt, ist hier nicht eindeutig zu sagen, ob dieses

eventuell als chemisches Chaparon fungiert oder wie im 1. Modell beschrieben mit sehr geringer Affinität an eine überlappende Bindestelle an der GbsR-Effektordomäne bindet.

## **2. GbsR: eine neue Familie von transkriptionellen Repressoren**

### **2.1 Die evolutionäre Verbreitung von GbsR-ähnlichen Proteinen innerhalb der Bakterien**

Datenbankanalysen mit der NCBI-Datenbank mit der Aminosäuresequenz von GbsR mit dem BLAST-Algorithmus nach Altschul zeigten wie bereits erwähnt eine Verbreitung innerhalb der *Bacteria*, genauer in der Ordnung der *Bacillales*. Hauptsächlich ist GbsR in einer Reihe von *Bacillen* und *Staphylococcen* zu finden. Laut dieser Datenbankanalyse konnte GbsR keiner bekannten Familie zugeordnet werden. Allerdings weist das GbsR-Protein eine Zuordnung zu der COG1510, einem Cluster der orthologen Gruppe 1015, auf, welche das Protein als transkriptionellen Regulator identifiziert.

Die Fähigkeit Cholin mit Hilfe der Enzyme GbsA und GbsB zu Glycin Betain zu oxidieren ist allerdings nicht allen Mitgliedern der Familie *Bacillaceae* gemein. So besitzen die im Boden lebenden Gram-positiven Mikroorganismen der *Bacillus cereus*-Gruppe, *B. anthracis*, *B. thuringiensis* und *B. cereus* keine Glycin Betain-Synthesegene und somit auch kein GbsR-ähnliches Protein (Tab. 18). Eine Ausnahme bildet hier *B. cereus subsp. Cytotoxis*. In dieser Art konnte als einziger Vertreter der *B. cereus*-Gruppe sowohl die Glycin Betain Synthesegene als auch der Regulator GbsR gefunden werden.

Aufgrund weitergehender Analysen der Genumgebung von GbsR-ähnlichen Proteinen, lassen sich diese in drei Gruppen einteilen. Gruppe 1 beinhaltet all die Proteine, die sich als Regulatorgen in der Nähe der Glycin Betain Synthesegene befinden. Zu dieser Gruppe zählen GbsR-ähnliche Proteine aus den *Bacillen* und *Staphylococcen*. Die *Staphylococcen* zeigen in ihrer Genanordnung jedoch eine Besonderheit, dort liegt das GbsR-ähnliche Protein zwischen den Glycin Betain Synthesegenen und dem Gen für einen Cholin-Transporter. GbsR und die Glycin Betain Synthese Gene sind in vielen *Staphylococcen* hoch konserviert, CudC aus *Staphylococcus xylosus* weist eine 54 %ige Identität zu GbsR aus *B. subtilis* auf (Rosenstein *et al.*, 1999). Aber auch andere *Staphylococcen*, wie verschiedene *Staphylococcus aureus* Stämme, *Staphylococcus haemolyticus* und *Staphylococcus epidermidis* weisen diese Organisation der Gene auf (siehe Anhang D). In Gruppe 2 handelt es sich um GbsR-ähnliche Proteine, die sich neben den Genen für einen vermuteten Transporter für kompatible Solute

befinden (z.B. OpuA, OpuB und OpuC) (Anhang D). Gruppe 3 beinhaltet GbsR-ähnliche Proteine, die weder in der Nähe von Glycin Betain Synthesegenen noch in der Nähe eines Transporters für kompatible Solute lokalisiert sind. Zu dieser Gruppe zählt unter anderem das Mj223-Protein aus *M. jannaschii*.

## 2.2 Evolutionäre Entwicklung in *B. subtilis*

In *B. subtilis* wird die Cholinaufnahme von dem OpuB- und OpuC-System vermittelt. OpuB und OpuC sind ABC-Transporter, die evolutionär sehr nah verwandt sind. Wie schon erwähnt, kann OpuC das größte Spektrum an Substraten aufnehmen (Bremer & Krämer, 2000) und besitzt eine gute Affinität zu Cholin ( $K_m = 38 \mu\text{M}$ ). OpuB, auch ein Bindeprotein-abhängiges Transportsystem, hingegen ist für die hochaffine Aufnahme von Cholin ( $K_m = 1 \mu\text{M}$ ) aus dem Medium verantwortlich (Kappes *et al.*, 1999). Die Strukturgene von OpuB und OpuC sind nur ein paar Kilobasen auf dem *B. subtilis* Chromosom voneinander entfernt, und ihre Genprodukte besitzen eine hohe Sequenzidentität zueinander (83 % für OpuBA/OpuCA, 85 % für OpuBB/OpuCB, 69 % für OpuBC/OpuCC und 85 % für OpuBD/OpuCD). Diese Tatsachen legen nahe, dass die *opuB*- und *opuC*-Loci durch eine Genduplikation entstanden sind (Kappes *et al.*, 1999) und sich dann hinsichtlich ihrer Substratspezifität evolutiv weiterentwickelt haben (OpuC).

In der Evolution spielen Selektionsdruck und Weiterentwicklung eine wichtige Rolle. Die Genduplikation gilt als ein wesentlicher Mechanismus der Evolution. Genduplikationen haben eine dauerhafte Verdoppelung einzelner Gene oder Gengruppen zur Folge, welche sich anschließend getrennt weiter entwickeln. Durch Mutationen der Gen-Kopie können funktionell neue Gene entstehen bzw. das Spektrum der ursprünglichen Genaktivität erweitert werden (Poelwijk *et al.*, 2006). So ist auch für einen *Bacillus subtilis*-Vorläufer denkbar, dass dieser zu Beginn nur im Besitz der Glycin Betain Synthesegene und dem Cholintransporter OpuB war. Aufgrund von Selektionsdruck und neuen Lebensanforderungen kam es zu einer Genduplikation. Diese Genduplikation ermöglichte *B. subtilis* einen evolutionären Vorteil, denn dieser ist nun in der Lage nicht nur Cholin, sondern ein breites Spektrum an kompatiblen Soluten durch OpuC aufzunehmen (Bremer & Krämer, 2000). Nun ist es aber nicht sinnvoll, dass auch OpuC durch GbsR kontrolliert wird, da Cholin nicht das alleinige Substrat für OpuC, sondern eines von vielen ist. Daraus ergibt sich nun die Frage wie es der Zelle gelungen ist, das *opuC*-Operon der Kontrolle durch GbsR zu entziehen. Bei genauer Betrachtung der Promotorregionen von *opuB* und *opuC* wird deutlich, dass nur vier

Mutationen in der *opuC*-Promotorregion nötig waren, um nicht mehr der GbsR-Kontrolle zu unterliegen. Ein für die Zukunft interessanter Versuch wäre, die Region hinter der *gbsAB*-Promotorregion so zu mutieren, dass sie der *opuC*-Promotorregion entspricht, dann sollte die *gbsAB*-Expression nicht mehr durch GbsR kontrolliert werden, auch sollte keine Bindung von GbsR an die mutierte DNA-Region mehr stattfinden. Weiterhin wäre es interessant aus der *opuC*-Promotorregion eine *opuB*-Promotorregion zu formen. Dies sollte dazu führen, dass die *opuC*-Expression dann durch GbsR-kontrolliert wird. Wenn dies gelingen würde, wäre der Beweis erbracht, dass in der Evolution vier Mutationen genügen, um einen Verlust der GbsR-Kontrolle zu erreichen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es sich bei GbsR um einen Repressor handelt, der durch aktive Bindung von Cholin die Expression des *gbsAB*-Operons induziert. Weiterhin reguliert GbsR die Gene für die Aufnahme von Cholin durch den ABC-Transporter OpuB. Die Funktion als DNA-bindendes Protein konnte durch Bandshift-Analysen bestätigt werden. Eine Einteilung von GbsR in die Gruppe der Winged-Helix-Turn-Helix Proteine konnte aufgrund bioinformatischer Daten erfolgen. Eine weitere Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass GbsR durch einen negativen Feedback-Loop des Syntheseproduktes Glycin Betain kontrolliert wird.

Für die Zukunft sind noch eine Reihe von Experimenten erforderlich, so muss geklärt werden, wie Glycin Betain Einfluss auf GbsR nimmt. Auch die Bindebox für Cholin muss identifiziert werden. Dies könnte durch eine Mutagenesestudie der konservierten Aromaten erfolgen. Auch die Bestätigung der identifizierten Operator-DNA für GbsR durch Footprint-Analysen und eine Mutagenese der vermuteten GbsR-Bindestelle ist erforderlich. Zum Schluss wäre es von großer Bedeutung, wenn eine Kristallstruktur von GbsR erhalten werden könnte. Daran wird bereits in Zusammenarbeit mit Prof. L. Schmitt (Universität Düsseldorf) gearbeitet.

**Tabelle 18: Die Tabelle zeigt die Verbreitung von GbsR und GbsR-ähnlichen Proteinen, die Verbreitung der Glycine Betaine Synthese Gene sowie die Verbreitung der Aufnahmesysteme von Cholin bzw. Glycin Betain.**

Stamm	<i>gbsR</i>	<i>gbsAB</i>	<i>gbsR-ähnliche</i>	<i>opuB</i>	<i>opuC</i>	Zusatzinformation
<i>Bacillus subtilis</i> [F]	+	+	+	+	+	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42 [F]	+	+	+	+	+	
<sup>1</sup> <i>Bacillus anthracis</i>	-	-	-	-	-	<i>opuA</i> ; BCCT-Transporter: Cholin, GB
<sup>2</sup> <i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	<i>opuA</i>
<i>Bacillus cereus</i> subsp. <i>Cytotoxis</i> [F]	+	+	-	-	-	BCCT-Transporter: Cholin, Charnitin, Betaine
<i>Bacillus clausii</i> KSM-K16 [F]	+	+	+	-	-	<i>opuA</i>
<i>Bacillus coagulans</i> 36-D1 [U]	-	-	+	-	+	<i>opuA</i>
<i>Bacillus halodurans</i> C-125 [F]	-	<i>gbsA</i>	-	-	+ ?	<i>opuD</i> , GB-Tansporter
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 [F]	+	+	+	-	+	
<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032 [F]	+	+	+	-	+	
<i>Bacillus selenitireducens</i> MLS 10 [U]	+	<i>gbsA</i>	+	-	-	<i>opuA</i>
<i>Bacillus</i> sp. B14905 [U]	-	-	-	-	-	<i>opuA</i> , <i>opuD</i>
<i>Bacillus</i> sp. NRRL B-14911 [U]	-	evtl.	+	+ ?	+ ?	<i>opuA</i>
<i>Bacillus</i> sp. SG-1 [U]	-	-	-	-	-	<i>opuA</i> ; BCCT-Transporter: Cholin, Charnitin, GB
<sup>3</sup> <i>Bacillus thuringiensis</i>	-	-	-	<i>opuBB</i>	<i>opuCA</i>	<i>opuA</i> , <i>opuD</i>
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> KBAB4 [F]	-	-	-	-	-	<i>opuA</i> ; BCCT-Transporter: Cholin, Charnitin, GB
<i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426 [F]	-	+	-	-	+	<i>opuA</i>
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2 [F]	-	-	-	-	?	<i>opuA</i>
<i>Halobacillus dabaniensis</i> [U]	+	+	-	-	-	<i>opuA</i>

1) Folgende *B. anthracis*-Stämme wurden untersucht: *B. anthracis* A0174 [U], *B. anthracis* A0193 [U], *B. anthracis* A0389 [U], *B. anthracis* A0422 [U], *B. anthracis* A0465 [U], *B. anthracis* A0488 [U], *B. anthracis* A2012 [U], *B. anthracis* Ames [F], *B. anthracis* Ames Ancestor [F], *B. anthracis* Sterne [F], *B. anthracis* Tsiankovskii-I [U]

2) Folgende *B. cereus*-Stämme wurden untersucht: *B. cereus* 03BB108 [U], *B. cereus* AH1134 [U], *B. cereus* AH187 [U], *B. cereus* AH820 [U], *B. cereus* ATCC 10987 [F], *B. cereus* ATCC 14579 [F], *B. cereus* B4264 [U], *B. cereus* E33L [F], *B. cereus* G9241 [U], *B. cereus* G9842 [U], *B. cereus* H3081.97 [U], *B. cereus* NVH0597-99 [U], *B. cereus* W [U]

3) Folgende *B. thuringiensis*-Stämme wurden untersucht: *B. thuringiensis* Al Hakam [F], *B. thuringiensis* vs *israelensis* ATCC 35646 [U], *B. thuringiensis* vs *konkukian* 97-27 [F]

[F] steht für finished Sequenz, [U] steht für unfinished Sequenz

## VI. Literatur

- Alia, H. H., Sakamoto, A. and Murata, N.** (1998). Enhancement of the tolerance of *Arabidopsis* to high temperatures by genetic engineering of the synthesis of glycinebetaine. *Plant J.*, **16**: 155-161.
- Albright, R. A., Joh, K. and Morais-Cabral, J. H.** (2007). Probing the structure of the dimeric KtrB membrane protein. *J. Biol. Chem.* **282**: 35046-35055
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lippmann, D. J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res.*, **25**: 3389-3402.
- Ambulos, N. P., Jr., Duvall, E. J. and Lovett, P. S.** (1987). The mRNA for an inducible chloramphenicol acetyltransferase gene is cleaved into discrete fragments in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **169**: 967-972.
- Arakawa, T. and Timasheff, S. N.** (1985). The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys. J.*, **47**: 411-414.
- Aravind, L., Anantharaman, V., Balaji, S., Babu, M. M., and Iyer, L. M.** (2005). The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol Rev.* **29**: 231-62.
- Arora, A., C. Ha and Park, C. B.** (2004). Inhibition of insulin amyloid formation by small stress molecules. *FEBS Lett* **564**: 121-125.
- Atkinson, D. E.** (1977). Cellular energy metabolism and its regulation, Academic Press, New York.
- Barzantny, H.** (2008). Aufnahmen und Verwertung von Prolin und Prolinhaltigen Oligopeptiden unter hyperosmolaren Umweltbedingungen in *Bacillus subtilis*. Diplomarbeit Philipps- Universität Marburg.

**B.P.M. Willems, Marketing & Technology Consult BV, Niederlande, J. Jokinen, Fortum Oil Oy, Finland** (2004). Kälte- und Wärmeträger auf Betain-Basis. Eine natürliche Lösung für Umwelt-, Toxizitäts- und Korrosionsschutzproblemen in Heiz- und Kühlsystemen. Manuskript DKV Tagung AA.II.1.7

**Bayles, D. O. and Wilkinson, B. J.** (2000). Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* **30**: 23-27.

**Bernhardt, J., Völker, U., Völker, A., Antelmann, H., Schmid, R., Mach, H. and Hecker, M.** (1997). Specific and general stress proteins in *Bacillus subtilis*--a two-deimensional protein electrophoresis study. *Microbiology* **143**: 999-1017.

**Belitsky, B. R., Brill, J., Bremer, E. and Sonenshein, A. L.** (2001). Multiple genes for the last step of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**: 4389-4392.

**Belitsky, B. R.** (2002) Biosynthesis of Amino Acids of the Glutamate and Aspartate Families, Alanine, and Polyamines. In: „*Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells”. (Ed.: A.L. Sonenshein *et al.*), pp 203- 232. ASM Press, Washington, D.C.

**Belitsky, B. R., Kim, H. J., and Sonenshein, A. L.** (2004). CcpA-dependent regulation of *Bacillus subtilis* glutamate dehydrogenase gene expression. *J Bacteriol* **186**: 3392-3398.

**Birnboim, H. C. and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**: 1513-23.

**Boch, J.** (1996) Anpassung von *Bacillus subtilis* an hochosmolare Wachstumsbedingungen: Synthese der osmotischen Schutzsubstanz Glycin Betain. Dissertation, Universität Marburg.

**Boch, J., Kempf, B. and Bremer, E.** (1994). Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *J. Bacteriol.*, **176**: 5364-5371.



- Boch, J., Kempf, B., Schmid, R., and Bremer, E.** (1996) Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*: characterization of the *gbsAB* genes. *J. Bacteriol.* **178**: 5121-5129.
- Bohnert, H. J., Nelson, D. E. und Jensen, R. G.** (1995). Adaptations to Environmental Stresses. *Plant Cell* **7**: 1099-1111.
- Bolen, D. W. and Baskakov, I. V.** (2001). The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *J. Mol. Biol.*, **310**: 955-963.
- Boyd, L. A., Adam, L., Pelcher, L. E., McHughen, A., Hirji, R. and Selvaraj, G.** (1991). Characterization of an *Escherichia coli* gene encoding betaine aldehyde dehydrogenase (BADH): structural similarity to mammalian ALDHs and a plant BADH. *Gene* **103**: 45-52.
- Bourot, S., Sire, O., Trautwetter, A., Touzé, T., Wu, L.F., Blanco, C. and Bernard, T.** (2002). Glycine betaine-assisted protein folding in a *lysA* mutant of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **275**: 1050-1056.
- Bremer, E.** (2002) Adaptation to changing osmolarity. In: „*Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells”. (Ed.: A.L. Sonenshein *et al.*), pp 385 - 389. *ASM Press*, Washington, D.C.
- Bremer, E. and Krämer, R.** (2000). Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In: “Bacterial responses” (G. Storz and R. Hengge-Aronis (ed.)) *ASM Press*, Washington, D.C., 79-97.
- Brennan, R. G. and Matthews, B. W.** (1989). The Helix-Turn-Helix DNA binding motif. *J. Biol. Chem.* **204**: 1903-1906.
- Brigulla, M., Hoffmann, T., Krisp, A., Völker, A., Bremer, E. and Völker, U.** (2003). Chill induction of the SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and its contribution to low-temperature adaptation. *J. Bacteriol.*, **185**: 4305-4314.

- Brill, J.** (2002) Biosynthese und Anhäufung der osmotischen Schutzsubstanz Prolin mittels *de novo* Synthese und Aufnahme prolinhaltiger Peptide in *Bacillus subtilis*. Dissertation. Philipps- Universität Marburg.
- Brouquisse, R., Weigel, P., Rhodes, D., Yocum, C. F., Hanson, A. D.** (1989). Evidence for a ferredoxin-dependent choline monooxygenase from spinach chloroplast stroma. *Plant Physiol.* **90**: 322-329.
- Brown, A. D.** (1976) Microbial water stress. *Bacteriol Rev* **40**: 803 - 846.
- Brown, A. and Simpson, J.** (1972). Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J. Gen. Microbiol.*, **72**: 589-591.
- Bünger, J. and Driller, H.** (2004). Ectoin: An effective natural substance to prevent UVA-induced premature photoaging. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **17** : 232-237.
- Burg, M. B., Kwon, E. D. and Kultz, D.** (1997). Regulation of gene expression by hypertonicity. *Annu Rev Physiol* **59**: 437-455.
- Burg, M. B. and Ferraris, J. D.** (2008). Intracellular organic osmolyte: function and regulation. *J. Biol. Chem.*, **283**: 7309-7313.
- Bursy, J., Pierik, A.J., Pica, N. and Bremer, E.** (2007). Osmotically induced synthesis of the compatible solute hydroxyectoine is mediated by an evolutionary conserved ectoine hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **282**: 31147-31155.
- Busenlehner, L. S., Pennella, M. A. and Giedroc, D. P.** (2003). The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: Structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiol Rev.* **27**: 131-43.
- Buxton, R.S.** (1980) Selection of *Bacillus subtilis* strain 168 mutants with deletions of the PBSX prophage. *J Gen Virol* **46**: 427 - 437.

- Calamita, G., Bishai, W. R., Preston, G. M., Guggino W. B. and Agre, P. (1995).** Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**: 29063-29066.
- Cayley, S., Lewis, B.A., Record, T.M. Jr. (1992)** Origins of the osmoprotective properties of betaine and proline in *Escherichia coli* K-12. *J Mol Biol* **273**: 75 - 83.
- Clark, K. L, Halay, E. D, Lai, E. and Burley, S. K. (1993).** Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature*. **364**: 412-20.
- Courtenay, E. S., Capp, M. W., Anderson, C. F. and Record Jr., M. T. (2000).** Vapor pressure osmometry studies of osmolyte-protein interactions: implications for the action of osmoprotectants in vivo and for the interpretation of “osmotic stress” experiments in vitro. *Biochemistry*, **39**: 4455-4471.
- Csonka, L. N. (1989).** Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.*, **53**: 121-147.
- Csonka, L. N. and Epstein, W. (1996).** Osmoregulation. In: F. C. Neidhard, R. Curtis III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schächter, H. E. Umbarger (Herausg.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. *ASM Press*, Washington, D. C., 1210-1223.
- Csonka, L. N. and Hanson, D. (1991).** Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 569-606.
- Cummings, S. P. and Gilmour, D. J. (1995).** The effect of NaCl on the growth of a *Halomonas species*: accumulation and utilization of compatible solutes. *Microbiology* **141**: 1413-1418.
- Daber, R., Stayrook, S., Rosenberg, A. and Lewis, M. (2007).** Structural analysis of Lac Repressor bound to allosteric effectors. *J. Mol. Biol.* **370**: 609-619.

- da Costa, M. S., Santos, H. and Galinski, E. A.** (1998). An overview of the role and diversity of compatible solutes in *Bacteria* and *Archaea*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **61**: 117-153.
- Davidson, A.L., Dassa, E., Orelle, C. and Chen, J.** (2008). Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**: 317-364,
- Dennis, P. P. and Shimmin, L. C.** (1997). Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**: 90-104.
- Delauney, A. J., and Verma, D. P.** (1990) A soybean gene encoding delta 1-pyrroline-5-carboxylate reductase was isolated by functional complementation in *Escherichia coli* and is found to be osmoregulated. *Mol Gen Genet* **221**: 299-305.
- Diamant, S., Eliahu, N., Rosenthal, D. and Goloubinoff, P.** (2001). Chemical chaperones regulate molecular chaperones *in vitro* and in cells under combined salt and heat stresses. *J Biol Chem* **276**: 39586-39591.
- Diamant, S., Rosenthal, D., Azem, A., Eliahu, N., Ben-Zvi, A. P. and Goloubinoff, P.** (2003). Dicarboxylic amino acids and glycine-betaine regulate chaperone-mediated protein-disaggregation under stress. *Mol Microbiol* **49**: 401-410.
- Dinnbier, U., Limpinsel, E., Schmid, R. and Bakker E. P.** (1988). Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch. Microbiol.*, **150**: 348-357.
- Dodd, I. B. and Egan, J. B.** (1990). Improved detection of helix-turn-helix DNA-binding motifs in protein sequences. *Nucleic Acids Res* **18**: 5019-5026
- Dolezal, M.** (2006) Die osmotische Regulation des *proHJ*-Operons aus *Bacillus subtilis*. Diplomarbeit. Philipps- Universität Marburg.
- Dougherty, D. A.** (1996). Cation- $\pi$  Interactions in Chemistry and Biology: A New View of Benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science*, **271**: 163-168.

**Eshoo, M. W.** (1988). lac fusion analysis of the bet genes of *Escherichia coli*: regulation by osmolarity, temperature, oxygen, choline, and glycine betaine. *J Bacteriol.* **170**: 5208-5215.

**Falkenberg P. and Strøm A. R.** (1990). Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta.* **1034**: 253-9.

**Filée, P., Delmarcelle, M., Thamm, I. and Joris, B.** (2001). Use of an ALFexpress DNA sequencer to analyze protein-nucleic acid interactions by band shift assay. *Biotechniques.* **30**: 1044-1048, 1050-1051.

**Fisher, S. H. and Sonenshein, A. L.** (1991). Control of carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Microbiol* **45**: 107-135.

**Fujita, Y., Fujita, T., Miwa, Y. Nihashi, J. and Arantani, Y.** (1986). Organization and transcription of the gluconate operon, *gnt*, of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **261**:13744-13755.

**Gajiwala, K. S. and Burley, S. K.** (2000). Winged helix proteins. *Curr Opin Struct Biol.* **10**: 110-6.

**Gajiwala, K. S., Chen, H., Cornille, F., Roques, B. P., Reith, W., Mach, B. and Burley, S. K.** (2000). Structure of the winged-helix protein hRFX1 reveals a new mode of DNA binding. *Nature.* **403**: 916-21.

**Galinski, E. A.** (1993). Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interactions, stress protection. *Experientia* **49**: 487-496.

**Galinski, E. A.** (1995). Osmoadaptation in bacteria. *Adv Microb Physiol* **37**: 272-328.

**Galinski, E. A., and H. G. Trüper.** (1994). Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, **15**: 95-108.

**Gilbert W and Müller-Hill B.** (1966). Isolation of the Lac repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **56**: 1891-1898.

**Gotsche, S., and Dahl, M. K.** (1995) Purification and characterization of the phospho -  $\alpha$  - (1,1) – glucosidase (TreA) of *Bacillus subtilis* 168. *J Bacteriol* **174**: 2711 – 2716.

**Gramman, K., Volke, A. and Kunte, H. J.** (2002). New type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the bacteria domain: TRAP transporter TeaABC mediates uptake of ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM2581 (T). *J. Bacteriol.*, **184**: 3078-3085.

**Grant, W. D.** (2004). Life at low water activity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**: 1249-1267.

**Guermeur, Y., Geourjon, C., Gallinari, P. and Deleage, G.** (1999). Improved Performance in Protein Secondary Structure Prediction by Inhomogeneous Score Combination. *Bioinformatics* **15**: 413-421

**Guillouet, S. and J. M. Engasser** (1995). Sodium and proline accumulation in *Corynebacterium glutamicum* as a response to an osmotic upshock. *Appl Microbiol Biotechnol* **43**: 315-320.

**Gutierrez, C., Abee, T. and Booth, I. R.** (1995). Physiology of the osmotic stress response in microorganisms. *Int J Food Microbiol* **28**: 233-244.

**Hagemann, M., Richter, S. and Mikkat, S.** (1997). The *ggtA* gene encodes a subunit of the transport system for the osmoprotective compound glucosylglycerol in *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. *J. Bacteriol.*, **179**: 714-720.

**Haldenwang, W. G.** (1995). The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev.* **59**. 1-30.

**Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**: 557-580.

**Hanson, A.D.** (1993). Compatible solute synthesis and compartmentation in higher plants, p. 53-60. In: G.N. Somero and C.B. Osmond (ed.), Water and Life. Springer Verlag.

**Hanson, A. D. and Wyse, R.** (1982). Biosynthesis, Translocation, and Accumulation of Betaine in Sugar Beet and Its Progenitors in Relation to Salinity. *Plant Physiol.* **70**: 1191-1198.

**Harwood, C. R., and Cutting, S. M.** (1990) Molecular biological methods for *Bacillus*. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, England.

**Harwood, C. R., and Archibald, A. R.** (1990). Growth, maintenance and general techniques. In Molecular biological methods for *Bacillus*. Edited by C. R. H. a. S. M. C. (ed.), John Wiley & Sons, Inc., Chichester, United Kingdom: 1-26.

**Hecker, M., Schumann, B., and Völker, U.** (1996) Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**: 417 – 428.

**Hecker, M and Völker, U.** (1998). Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the sigmaB regulon. *Mol Microbiol.* **29**: 1129-1136. Review.

**Hecker, M and Völker, U.** (2001). General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv Microb Physiol.* **44**: 35-91. Review.

**Helfert, C., Gotsche, S., and Dahl, M.** (1995) Cleavage of trehalose–phosphate in *Bacillus subtilis* is catalysed by a phospho- $\alpha$  (1,1)-glucosidase encoded by the *treA* gene. *Mol Microbiol* **16**: 111 – 120.

**Hengge-Aronis, R.** (1996). Regulation of gene expression during entry into stationary phase. In *Escherichia coli* and *Salmonella*, cellular and molecular biology. Edited by F. C. Neidhard, R. Curtiss III, J. L. Ingraham *et al.*, ASM Press, Washington, D. C., USA.: 1497-1512.

**Hengge-Aronis, R.** (1999). Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol* **2**: 148-152.

**Hincha, D. K. and Hagemann, M.** (2004). Stabilization of model membranes during drying by compatible solutes involved in the stress tolerance of plants and microorganisms. *Biochem. J.*, **383**: 277-283

**Hoffmann, T., Schütz, A., Brosius, M., Völker, A., Völker, U. and Bremer, E.** (2001). High-salinity-induced iron limitation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **184**: 718-727.

**Hoffmann, T., Boiangiou, C., Moses, S. and Bremer, E.** (2008). Responses of *Bacillus subtilis* to hypotonic challenges: physiological contributions of mechanosensitive channels to cellular survival. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:2454-2460.

**Hoffmann, T. and Bremer, E.** (in Vorbereitung) *Bacillus subtilis* at low temperature.

**Höing, Marina** (2008). Strukturelle und funktionelle Untersuchungen an Substratbindeproteinen aus ABC-Transportern zur Aufnahme von kompatiblen Soluten. Dissertation. Universität Marburg.

**Holmstrom, K. O., Somersalo, S., Mandal, A., Palva, T. E. and Welin, B.** (2000). Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *J. Exp. Bot.*, **51**: 177-185.

**Holtmann, G.** (2002). Charakterisierung eines ABC-Transporters für kompatible Solute in dem hyperthermophilen Archaeon *Archaeoglobus fulgidus* und Untersuchungen zur thermoprotektiven Wirkung kompatibler Solute in *Bacillus subtilis*. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.

**Holtmann, G., Bakker, E. P., Uozumi N. and Bremer, E.** (2003). KtrAB and KtrCD: two K<sup>+</sup> uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity. *J Bacteriol* **185**: 1289-1298.

**Holtmann, G., Boiangiu, C., Brill, J., Hoffmann, T., Kuhlmann, A. U., Moses, S., Nau-Wagner, G., Pica, N. and Bremer, E.** (2004). Physiological and molecular responses of *Bacillus subtilis* to hypertonicity: utilization of evolutionarily conserved adaptation strategies.



In Halophilic Microorganisms. Edited by A. Ventosa. Berlin, Germany, Springer-Verlag,: 115-134.

**Holtmann, G. and Bremer, E.** (2004). Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: involvement of Opu transporters. *J. Bacteriol.*, **186**: 1683-1693.

**Höltje, J. V.** (1998). Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 181-203.

**Horn, C., Jenewein, S., Sohn-Bösser, L. and Bremer, E.** (2005). Biochemical and structural analysis of the *Bacillus subtilis* ABC transporter OpuA and its isolated subunits. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **10**: 76-91.

**Ignatova, Z. and Gierasch, L. M.** (2006). Inhibition of protein aggregation in vitro and in vivo by a natural osmoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**:13357-13361.

**Ignatova, Z. and Gierasch, L. M.** (2007). Effects of osmolytes on protein folding and aggregation in cells. *Methods Enzymol.* **428**:355-372.

**Ikuta, M. A., Chakrvarti, A. and Taylor, R. F.** (1977). Purification and characterization of choline oxidase from *Arthrobacter globiformis*. *J. Biochem.* **82**: 1741-1749.

**Jebbar, M., Gouesbet, G., Himdi-Kabbab, S., Blanco, C. and Bernard, T.** (1995). Osmotic adaptation in *Brevibacterium linens*: differential effect of proline and glycine betaine on cytoplasmic osmolyte pool. *JBIC* **1**: 380-386.

**Kaasen, I., McDougall, J. and Strom, A. R.** (1994). Analysis of the *otsBA* operon for osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli* and homology of the OtsA and OtsB proteins to the yeast trehalose-6- phosphate synthase/phosphatase complex. *Gene* **145**: 9-15.

**Kappes, R.M., Kempf, B., and Bremer, E.** (1996) Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. *J Bacteriol* **178**: 5071-5079.

- Kappes, R. M., Kempf, B., Kneip, S., Boch, J., Gade, J., Meier – Wagner, J., and Bremer, E.** (1999) Two evolutionarily closely related ABC – transporters mediate the uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **32**: 203–216.
- Kawahara, Y., Ohsumi, T., Yoshihara, Y. and Ikeda, S.** (1989). Proline in the osmoregulation of *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric Biol Chem* **53**: 2475-2479.
- Kempf, B. and Bremer, E.** (1995) OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **270**: 16701-16713.
- Kempf, B., Gade, J. and Bremer, E.** (1997). Lipoprotein from the osmoregulated ABC transport system OpuA of *Bacillus subtilis*: purification of the glycine betaine binding protein and characterization of a functional lipidless mutant. *J. Bacteriol.*, **179**: 6213-6220.
- Kempf, B. and Bremer, E.** (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.*, **170**: 319-330.
- Kempf, B., and Bremer, E.** (2000) Water – deficient environments. In „ Encyclopedia of Microbiology“. Vol.4, pp. 884-897. *Academic Press*.
- Kiene, R. P., Hoffmann Williams, L. P. and Walker, J. E.** (1998). Seawater microorganisms have a high affinity glycine betaine uptake system which also recognizes dimethylsulfoniopropionate. *Aquat. Microb. Ecol.* **15**: 39-51.
- Koch, A. L.** (1983). The surface stress theory of microbial morphogenesis. *Adv Microb Physiol* **24**: 301-366.
- Krispin, O. and Allmansberger, R.** (1995). Changes in supertwist as a response of *Bacillus subtilis* towards different kinds of stress. *FEMS Microbiol Lett* **134**: 129-135.
- Krulwich, T. A., Masahiro, I., and Guffanti, A. A.** (2001) The Na<sup>+</sup> - dependence of alkaliphily in *Bacillus*. *Biochem Biophys Acta* **1505**: 158 – 168.

**Kuhlmann, A. U.** (2002). Biosynthese und Transport des kompatiblen Solutes Ectoin in *Bacillus* spp. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.

**Kuhlmann, A. U. and Bremer, E.** (2002). Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Appl Environ Microbiol* **68**: 772-783.

**Kuhlmann, A. U., Bursy J., Gimpe, I. S., Hoffmann, T., and Bremer, E.** (2008). Synthesis of the compatible solute ectoine in *Virgibacillus pantothenicus* is triggered by high salinity and low growth temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:4560-4563.

**Kunst, F., and Rapoport, G.** (1995) Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **177**: 2403-2407.

**Kyte, J. and Doolittle, R.** (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132

**Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-5.

**Lai, M. C., Yang, D. R. and M. J. Chuang** (1999). Regulatory factors associated with synthesis of the osmolyte glycine betaine in the halophilic methanoarchaeon *Methanohalophilus portucalensis*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 828-833.

**Lamark, T., Kaasen, I., Eshoo, M. W., Falkenberg, P., McDougall, J. and Strøm A. R.** (1991). DNA sequence and analysis of the bet genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**: 1049-1064.

**Lamark, T., Styrvold, O. B. and Strøm, A. R.** (1992). Efflux of choline and glycine betaine from osmoregulating cells of *Escherichia coli*. *FEMS Lett.* **96**: 149–154.

**Lamark, T., Røkenes, T.P., McDougall, J. and Strøm, A.R.** (1996). The complex bet promoters of *Escherichia coli*: regulation by oxygen (ArcA), choline (BetI), and osmotic stress. *J. Bacteriol.* **178**: 1655-1662

- Landfald, B. and Strøm, A. R.** (1986). Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **165**: 849-855.
- Lanyi, J. K.** (1974). Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.*, **38**: 272-290.
- Legaria, J., Rajsbaum, R., Muñoz-Clares, R. A., Villegas-Sepúlveda, N., Simpson, J. and Iturriaga, G.** (1998). Molecular characterization of two genes encoding betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth. Expression in leaves under short-term exposure to osmotic stress or abscisic acid. *Gene*. **218**: 69-76.
- Le Rudulier, D., Strom, A. R., Dandekar, A. M., Smith, L. T., and Valentine, R. C.** (1984) Molecular biology of osmoregulation. *Science* **224**: 1064 - 1068.
- Lewis, M.** (2005). The *lac* repressor. *C.R. Biologies* **328**: 521-548.
- Lippert, K. and Galinski, E. A.** (1992). Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl Microbiol Biotechnol* **37**: 61-65.
- Ma, J. C. and Dougherty, D. A.** (1997). The Cation- $\pi$  interaction. *Chem. Rev.*, **97**: 1303-24.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. and J. Parker** (2000). Biology of Microorganisms, Prentice Hall International Editions, Englewood Cliffs, N.J.
- Marmur, J. and Doty, P.** (1961). Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids. *J. Mol. Biol.*, **3**: 585-94.
- Martin, D. D., Bartlett, D. H. and Roberts, M. F.** (1999). Osmoadaptation in archaea. *Appl. Env. Microbiol.*, **65**: 1815-1825
- Matthews B.W.** (1988). Protein-DNA interaction. No code for recognition. *Nature*. **335**: 294-295

- Maul, B., Völker, U., Riethdorf, S., Engelmann, S., Hecker, M.** (1995)  $\sigma^B$  dependent regulation of *gsiB* in response to multiple stimuli in *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* **248**: 114–120.
- McCue, K. F. and Hanson, A. D.** (1992). Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. *Plant Mol Biol.* **18**: 1-11.
- McLaggan, D., Naprstek, J., Buurman, E.T., and Epstein, W.** (1994) Interdependence of  $K^+$  and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269**: 1911 - 1917.
- McNeil, S. D., Nuccio, M. L. & Hanson, A. D.** (1999). Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiol.* **120**: 945-950.
- Miller, J. H.** (1992). A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.)
- Miller, K. J. and J. M. Wood** (1996). Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Microbiol* **50**: 101-136.
- .
- Moses, S.** (1999) Molekulare und physiologische Charakterisierung der Prolinverwertung in *Bacillus subtilis* und Untersuchungen zum Efflux und Recycling von osmotischen Schutzsubstanzen. Dissertation. Philipps- Universität Marburg.
- Müller, V., Spanheimer, R. and Santos, H.** (2005) Stress response by solute accumulation in *Archaea*. *Curr Opin Microbiol* **8**: 729-736.
- Nakamura, T., Yokota, S., Muramoto, Y., Tsutsui, K., Oguri, Y., Fukui, K. and Takabe, T.** (1997). Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes. *Plant J.* **11**: 1115-1120

- Nakayama, H., Yoshida, K., Ono, H., Murooka, Y. and Shinmyo, A.** (2000). Ectoine, the compatible solute of *Halomonas elongata*, confers hyperosmotic tolerance in cultured tobacco cells. *Plant Physiol.*, **4**: 49-56.
- Nau-Wagner, G.** (1999). Physiologische und genetische Untersuchungen zur Biosynthese und Anhäufung osmotischer Schutzsubstanzen in *Bacillus subtilis*. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.
- Nyysola, A., Kerovuo, J., Kaukinen, P., von Weymarn, N. and Reinikainen, T.** (2000). Extreme halophiles synthesize betaine from glycine by methylation. *J Biol Chem.* **275**: 22196-22201.
- Nyysola, A. and Leisola, M.** (2001). *Actinopolyspora halophila* has two separate pathways for betaine synthesis. *Arch Microbiol* **176**: 294-300.
- Ohta, M., Miura, R., Yamano, T. and Miyake, Y.** (1983). Spectroscopic studies on the photoreaction of choline oxidase, a flavoprotein, with covalent bound flavin. *J. Biochem.* **94**: 197-203.
- Oren A.** (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems.* **4**: 2.
- Oswald, C., Smits, S. H. J., Höing, M. Sohn-Bösser, L., Dupont, L. Le Rudulier, D., Schmitt, L. and Bremer, E.** (2008). Crystal structures of choline/acetylcholine substrate-binding protein ChoX from *Sinorhizobium meliloti* in liganded and unliganded-closed states. *J. Biol. Chem.* **283**: 32848-32859.
- Pabo, C. O. and Sauer, R. T.** (1984). Protein-DNA recognition. *Annu Rev Biochem.* **53**: 293-321.
- Pabo, C.O. and Sauer R.T.** (1992). Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem.* **61**:1053-1095.

- Pérez-Rueda, E. and Collado-Vides, J.** (2001). Common history at the origin of the position-function correlation in transcriptional regulators in archaea and bacteria. *J Mol Evol.* **53**: 172-179.
- Peter, H., Weil, B., Burkovski, A., Krämer, R. and Morbach, S.** (1998). *Corynebacterium glutamicum* is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: identification, sequencing, and characterization of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP. *J. Bacteriol.*, **180**: 6005-6012.
- Petersohn, A., M. Brigulla, S. Haas, J. D. Hoheisel, U. Völker and M. Hecker** (2001). Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**: 5617-5631.
- Pflüger, K., and Müller, V.** (2004) Transport of compatible solutes in extremophiles. *J Bioenerg Biomembr* **36**: 17-24.
- Pflüger, K., Baumann, S., Gottschalk, G., Lin, W., Santos, H., and Müller, V.** (2003) Lysine-2,3-aminomutase and beta-lysine acetyltransferase genes of methanogenic archaea are salt induced and are essential for the biosynthesis of N-epsilon-acetyl-beta-lysine and growth at high salinity. *Appl Environ Microbiol* **69**: 6047-6055.
- Picossi S., Belitsky B. R. and Sonenshein, A. L.** (2007). Molecular mechanism of the regulation of *Bacillus subtilis* *gltAB* expression by GltC. *J Mol Biol.* **365**: 1298-1313.
- Pocard, J. A., Vincent, N., Boncompagni, E., Smith, L. T., Poggi, M. C. and Le Rudulier, D.** (1997). Molecular characterization of the bet genes encoding glycine betaine synthesis in *Sinorhizobium meliloti* 102F34. *Microbiology* **143**: 1369-1379.
- Poelwijk, F. J., Kiviet, D. J. and Tans, S. J.** (2006). Evolutionary potential of a duplicated repressor-operator pair: simulating pathways using mutation data. *PLoS Comput Biol.* **2**:e58.
- Price, C. W., P. Fawcett, H. Ceremonie, N. Su, C. K. Murphy and P. Youngman** (2001). Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **41**: 757-774.

- Quaye, O., Lountos, G. T., Fan, F., Orville, A. M. and Gadda, G.** (2008). Role of Glu312 in binding and positioning of the substrate for the hydride transfer reaction in choline oxidase. *Biochemistry*. **47**:243-256.
- Rathinasabapathi, B., Burnet, M., Russell, B. L., Gage, D. A., Liao, P., Nye, G. J., Scott, P., Golbeck, J. H. and Hanson, A. D.** (1997). Choline monooxygenase, an unusual iron-sulfur enzyme catalyzing the first step of glycine betaine synthesis in plants: Prosthetic group characterization and cDNA cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 3454-3458.
- Ray, S. S., Bonanno, J. B., Chen, H., de Lencastre, H., Wu, S., Tomasz, A. and Burley, S. K.** (2003). X-ray structure of an *M. jannaschii* DNA-binding protein: implications for antibiotic resistance in *S. aureus*. *Proteins*. **50**: 170-173.
- Record, M.T. Jr, Courtenay, E. S., Cayley, S. and Guttman, H. J.** (1998). Biophysical compensation mechanisms buffering *E. coli* protein-nucleic acid interactions against changing environments. *Trends Biochem Sci*. **23**:190-194. Review.
- Record, M.T. Jr, Courtenay, E. S., Cayley, S. and Guttman, H. J.** (1998). Responses of *E. coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. *Trends Biochem Sci*. **23**:143-8. Review.
- Reed, R. H., Borowitzka, L. J., Mackay, M. A., Chudek, J. A., Foster, R., Warr, S. C. R., Moore, D. J. and Stewart, W. D. P.** (1986). Organic solute accumulation in osmotically stressed cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev* **39**: 51-56.
- Reizer, J., A. Reizer and Saier, M. H.** (1994). A functional superfamily of sodium/solute symporters. *Biochim Biophys Acta* **1197**: 133-166.
- Rhodes, D. and Hanson, A. D.** (1993). Quarternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **44**: 357-384.
- Roberts, M. F.** (2000). Osmoadaptation and osmoregulation in archaea. *Front Biosci* **5**: D796-812.



**Roberts, M. F.** (2005). Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems*, **1**: 5.

**Røkenes, T. P., Lamark, T. and Strøm A. R.** (1996). DNA-binding properties of the BetI repressor protein of *Escherichia coli*: the inducer choline stimulates BetI-DNA complex formation. *J. Bacteriol.* **178**: 1663-1670.

**Rosenstein, R., Futter-Bryniok, D. and Götz, F.** (1999). The choline-converting pathway in *Staphylococcus xylosus* C2A: genetic and physiological characterization. *J Bacteriol.* **181**: 2273–2278.

**Rozwadowski, K. L., Khachatourians, G. G. and Selvaraj, G.** (1991). Choline oxidase, a catabolic enzyme in *Arthrobacter pascens*, facilitates adaption to osmotic stress in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 472-478.

**Russell, B. L., Rathinasabapathi, B. and Hanson, A. D.** (1998). Osmotic stress induces expression of choline monooxygenase in sugar beet and amaranth. *Plant Physiol.* **116**: 859-865.

**Ruzal, S.M., Lopez, C., Rivas, E., and Sanchez - Rivas, C.** (1998) Osmotic strength blocks sporulation at stage II by impeding activation of early sigma factors in *Bacillus subtilis*. *Curr Microbiol* **36**: 75 - 79.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. E.** (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Second Edition (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.)

**Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.

**Santos, H. and M. S. da Costa** (2002). Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. *Environmental Microbiology* **4**: 501-509.

**Saier, M. H. Jr., Eng, B. H., Fard, S., Garg, J., Haggerty, D. A., Hutchinson, W. J., Jack, D. L., Lai, E. C., Liu, H. J., Nusinew, D. P., Omar, A. M., Pao, S. S., Paulsen, I. T., Quan, J. A., Sliwinski, M., Tseng, T. T., Wachu, S. and Young, G. B.** (1999). Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analysis. *Biochem. Biophys. Acta.* **1422**, 1-56

**Saier, M. H. Jr.** (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**: 354-411.

**Saier, M. H. Jr.** (2000). Families of transmembrane sugar transport proteins. *Mol. Microbiol.*, **35**: 699-710.

**Schell, M. A.** (1993). Molecular biology of the LysR Family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 597-626.

**Schiefner, A., Breed, J., Bösser, L., Kneip, S., Gade, J., Holtmann, G., Diederichs, K., Welte W. and Bremer, E.** (2004). Cation- $\pi$  interactions as determinants for binding of the compatible solutes glycine betaine and proline betaine by the periplasmic ligand-binding protein ProX from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **279**: 5588-5596.

**Schnoor, M., Voss, P. Cullen, P., Boking, T., Galla, H. J., Galinski, E. A. and Lorkowski, S.** (2004). Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR enhancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **322**: 867-872.

**Schöck, F., and M. K. Dahl.** (1996). Expression of the *tre* operon of *Bacillus subtilis* 168 is regulated by the repressor TreR. *J. Bacteriol.* **178**: 4576-4581.

**Schöck, F., and M. K. Dahl.** (1996). Analysis of DNA flanking the *treA* gene of *Bacillus subtilis* reveals genes encoding a putative specific enzyme II<sup>Tre</sup> and a potential regulator of the trehalose operon. *Gene* **175**: 59-63.

**Schöck, F., Gotsche, S. and Dahl, M. K.** (1996). Vectors using the phospho- $\alpha$ -(1,1)-glucosidase-encoding gene *treA* of *Bacillus subtilis* as a reporter. *Gene* **170**: 77-80

- Severin, J., Wohlfarth, A. and Galinski, E. A.** (1992). The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1629-1638.
- Sibley, M. H. and J. H. Yopp** (1987). Regulation of S-Adenosylhomocysteine hydrolase in the halophilic cyanobacterium *Aphanothece halophytica*: a possible role in glycine betaine synthesis. *Arch Microbiol* **149**: 43-46.
- Sleator, R. D., C. G. M. Gahan und C. Hill** (2001). Mutations in the listerial *proB* gene leading to proline overproduction: Effects on salt tolerance and murine infection. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4560-4565.
- Sleator, R. D. and Hill, C.** (2002). Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 49-71.
- Smith, L. T., Pocard, J. A., Bernard, T. and Le Rudulier, D.** (1988). Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **170**: 3142-3149.
- Smits, S. H. J., Höing, M., Lecher, J., Jebbar, M., Schmitt L., and Bremer E.** (2008). The compatible solute-binding protein OpuAC from *Bacillus subtilis*: ligand-binding, site directed mutagenesis and crystallographic studies. *J. Bacteriol.* **190**: 5663-5671.
- Spiegelhalter, F. and E. Bremer** (1998). Osmoregulation of the *opuE* proline transport gene from *Bacillus subtilis*: contributions of the sigma A- and sigma B-dependent stress-responsive promoters. *Mol Microbiol* **29**: 285-296.
- Spizizen, J.** (1985). Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **44**: 1072-1078.
- Steger, R., Weinand, M., Krämer, R. and Morbach, S.** (2004). LcoP, an osmoregulated betaine/ectoine uptake system from *Corynebacterium glutamicum*. *FEBS Letters* **573**: 155-160.

- Steil, L., Hoffmann, T., Budde, I., Volker, U., and Bremer, E.** (2003) Genome-wide transcriptional profiling analysis of adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. *J Bacteriol* **185**: 6358-6370.
- Street, T. O., Bolen, D. W. and Rose, G. D.** (2006). A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 13997-14002.
- Styrvold, O. B., Falkenberg, P., Landfald, B., Eshoo, M.W., Bjørnsen, T. and Strøm, A. R.** (1986) Selection, mapping, and characterization of osmoregulatory mutants of *Escherichia coli* blocked in the choline-glycine betaine pathway. *J. Bacteriol.* **165**: 856-863.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.
- Tøndervik A., and Strøm A.R.** (2007). Membrane topology and mutational analysis of the osmotically activated BetT choline transporter of *Escherichia coli*. *Microbiology*. **153**: 803-813.
- Ventosa, A., Marquez, M. C., Garabito, M. J. and Arahall, D. R.** (1998). Moderately halophilic grampositive bacterial diversity in hypersaline environments. *Extremophiles*, **2**: 297-304.
- Völker, U., Maul, B., and Hecker, M.** (1999) Expression of a  $\sigma_B$  – dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**: 3942 – 3948.
- von Blohn, C.** (1997) Die Rolle des Transportsystems OpuE in *Bacillus subtilis* bei der Homöostase von Prolin unter hochosmotischen Umweltbedingungen. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.
- von Blohn, C., Kempf, B., Kappes, R. M., and Bremer, E.** (1997) Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. *Mol Microbiol* **25**: 175 – 187.

- Voss, S. and Skerra, A.** (1997). Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to a higher affinity for the *Strep*-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.*, **10**: 975-982.
- Wacker, I., Ludwig, H., Reif, I., Blencke, H. M., Detsch, C., and Stulke, J.** (2003) The regulatory link between carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: regulation of the *glxAB* operon by the catabolite control protein CcpA. *Microbiology* **149**: 3001-3009.
- Wargo, M. J., Szwergold, B. S. and Hogan, D. A.** (2008). Identification of two gene clusters and a transcriptional regulator required for *Pseudomonas aeruginosa* glycine betaine catabolism. *J Bacteriol.* **190**: 2690-2699.
- Welsh, D. T.** (2000). Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 263-290.
- Weretilnyk, E. A and Hanson, A. D.** (1991). Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**: 2745-2749.
- Whatmore, A. M. and Reed, R. H.** (1990). Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K<sup>+</sup> in turgor regulation. *J Gen Microbiol* **136**: 2521-2526.
- Whatmore, A. M., Chudek, J. A., and Reed, R. H.** (1990) The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* **136**: 2527 – 2535.
- Wilson, K., Shewchuk, L. M., Brennan, R.G., Otsuka, A. J., and Matthews, B. W.** (1992). *Escherichia coli* biotin holoenzyme synthetase/bio repressor crystal structure delineates the biotin- and DNA-binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 9257–9261.
- Wintjens, R. and Rooman, M.** (1996). Structural classification of HTH DNA-binding domains and protein-DNA interaction modes. *J Mol Biol.* **262**: 294-313.

**Wood, A. J., Saneoka, H., Rhodes, D., Joly, R. J. and Goldsbrough, P. B.** (1996). Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum. *Plant Physiol.* **110**: 1301-1308.

**Wood, J. M.** (1999). Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 230-262.

**Wood, J. M., Bremer, B., Csonka, L. N., Kraemer, R., Poolman, B., van der Heide, T. and Smith, L. T.** (2001). Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **130**: 437-460.

**Wood, M.** (2003). New plants shrug of salinity. *Agricultural Research magazine*

**Wood, J. M., Culham, D. E., Hillar, A., Vernikovska, Y. I., Liu, F., Boggs, J. M. and Keates, R. A.** (2005) A structural model for the osmosensor, transporter, and osmoregulator ProP of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **44**: 5634-5646.

**Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D. and Somero, G. N.** (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214-1222.

**Yancey, P.** (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.* **208**: 2819-2830.

**Zaccai, N. and Dougherty, D. A.** (1989). Cation- $\pi$  interactions in ligand recognition and catalysis. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**: 281-287.

**Zheng, N., Fraenkel, E., Pabo, C. O. and Pavletich, N. P.** (1999). Structural basis of DNA recognition by the heterodimeric cell cycle transcription factor E2F-DP. *Genes Dev.* **13**: 666-674.

## VII. Anhang A:

Im Folgenden ist die Nukleotidsequenz der *gbsR*- und *gbsAB*-Region aus *B. subtilis* dargestellt.

A



B

1	TCCGTTCAAT	GTGCTTTTCG	TGTTTGCAGT	AAATCCGCTT	GGCAATGTAA	ACTCCATAAC	GCCAAGGCTG	AGAAGCGTGT
	AGGCAAGTTA	CACAGAAAGC	ACAAACGTCA	TTTAGGCGAA	CCGTTACATT	TGAGGTATTG	CGGTTCCGAC	TCTTCGCACA
101	ATATCTGAGA	AAGACCATTC	CGTTTTGCTG	GCGCCAGTGA	TTGTTGCGAA	CAATGAAGCT	GTAGACTGTG	TTCTCATAGT
	TATAGACTCT	TTCTGGTAAG	GCAAAACGAC	CGCGGTCACT	AACAACGCTT	GTTACTTCGA	CATCTGACAC	AAGAGTATCA
201	TTGATGTAGA	TTCAGCCGCG	AAAGAAGCTG	TAGGTGCAGA	AACGAGTAAC	CCGAGACTTA	ATGCACTAAT	TGCCAAAGAA
	AACTACATCT	AAGTCGGCGC	TTCTTCGCAC	ATCCACGTCT	TTGCTCATTTG	GGCTCTGAAT	TACGTGATTA	ACG GTTTC TT
301	AACAAAATTC	CCCTAAAAA	ATGATAAATT	AAACAGGCCT	GCCCGCTTTT	CACCTCCTCT	GAAGGCCCAA	ATACAAATTT
	TTGTTTAAAG	GGGGATTTTT	TACTATTTAA	TTTGTCCGGA	CGGGCGAAAA	GTGGAGGAGA	CTTCCGGTT	TATGTTTAAA
401	CAAAATATTT	GGAAGTAAAT	GGGGTGTTTT	TCCCGTATTT	TTCAAATTTG	TAGTAGTTAC	ATCAAAAAAA	CGCCTAGTTT
	GTTTATAAAA	CCTTCATTTA	CCCCACAAAA	AGGGCATAAA	AAGTTTAAAC	ATCATCAATG	TAGTTTTTTT	GCGGATCAAA
501	CTTTGTTTCG	ACCGGTATAA	ATTTAAAAAT	TTCTCCGGTC	TGCACCGATT	CAGCAAGCCG	TTTCAGCCAG	TCATAGTAAG
	GAACAAAGC	TGGCCATATT	TAAATTTTAA	AAGAGGCCAG	ACGTGGCTAA	GTCGTTCGGC	AAAGTCGGTC	AGTATCATTC
-1	Lys Thr Glu Val Pro Ile Phe Lys Phe Ile	Glu Gly Thr Gln Val Ser Glu Ala Leu Arg	Lys Leu Trp Asp Tyr Tyr Ala					
601	TCATATAACT	GCAGTGCTTC	ATTTTTGATA	TCCTCATCGA	GATCTTCCTT	GCATAAAACC	TTTTGTAAAT	CAGCTTGAGC
	AGTATATTGA	CGTCACGAAG	TAAAACTAT	AGGAGTAGCT	CTAGAAGGAA	CGTATTTTGG	AAAACATTTA	GTCGAACCTG
-1	Asp Tyr Leu Gln Leu Ala Glu Asn Lys Ile Asp Glu Asp Leu Asp Glu Lys Cys Leu Val Lys Gln Leu Asp Ala Gln Ala							
701	TCACTGAAC	CTCCCGCTCC	CATTTAGGTG	GAAAGAAATT	TGTGAAAAAT	TAAAGAAAT	CCTTCTCAGC	CACAAATGTA
	AGTGAACCTG	GAGGGCGAGG	GTAAATCCAC	CTTTCTTTAA	ACACTTTTAA	AATTTCTTTA	GGAAGAGTCG	GTGTTTACAT
-1	Asn Val Gln Val Glu Arg Glu Trp Lys Pro Pro Phe Phe Asn Thr Phe Phe Lys Phe Phe Asp Lys Glu Ala Val Phe Thr His							
801	AAATGTTTTT	TTCACACAT	TAAAGTCTTG	AAGCTTTTTG	ACGCCAGTGC	TCATGCTTGG	TTTGCTCATT	TGCAACTCCT
	TTTACAAAAA	AAGTGATGTA	AATTCAGAAC	TTGAAAAAAC	TGCGGTCACG	AGTACGAACC	AAACGAGTAA	ACGTTGAGGA
-1	Phe Thr Lys Lys Val Val Asn Leu Asp Gln Leu Lys Lys Val Gly Thr Ser Met Ser Pro Lys Ser Met Gln Leu Glu Glu							
901	ATCTCATCCC	TCATATACAT	CGTCCCATAT	AAAAATCCGA	CAGTGCAGGT	AATTCCGTAA	AGATCCATCG	TTTCAGCAAT
	TAGAGTAGGG	AGTATATGTA	GCAGGGTATA	TTTTAGGGCT	GTGACGCCCA	TAAAGGCATT	TCTAGGTAGC	AAAGTCGTTA
-1	Met Glu Asp Arg Met Tyr Met Thr Gly Tyr Leu Ile Gly Val Ser Arg Thr Ile Gly Tyr Leu Asp Met Thr Glu Ala Ile							
1001	GAGCCTGTTT	TATAGCTGCA	AATTCGGAT	TTTCATCCAT	ACTGACCTTC	TTTTCTTTA	GAAAATTAAA	TTGTTAAGT
	CTCGGACAAG	ATATCGACGT	TAAAGACCTA	AAAGTAGGTA	TGACTGGGAG	AAAAGGAAAT	CTTTAATTTT	AAGCAATTCA
-1	Arg Ala Gln Glu Ile Ala Ala Phe Glu Pro Asn Glu Asp Met							
1101	CTTAACGAAA	CATGAGGAAA	AGTCAAAAAAG	AAAAATCAAA	ATGGGACTTT	GACAGTTTAA	AAACCATATG	TTAGATTAAAG
	GAATTGCTTT	GTACTCCTTT	TCAGTTTTTC	TTTTTAGTIT	TACCCTGAAA	CTGTCAAAT	TTTGGTATAC	AATCTAATTC
+3								
1201	TTTATTTAAC	AAACTTTTAT	TACGTCAAGG	AGGCTTATAT	GAGTCAAACA	TTATTCATTG	ACGGAGAATG	GATCAGTGCC
	AAATAAATTG	TTTGAAATAA	ATGCAGTTCC	TCCGAATATA	CTCAGTTTGT	AATAAGTAAC	TGCTCTTAC	CTAGTCACGG
+3	Ser Ile Ile Asn Pro Phe Asn Gln Glu Glu Ile Ala Thr Val Ser Glu Gly Gly Arg Glu Asp Ala Ile Lys Ala Ile Ala Ala							
1301	TATTATCAAC	CCATTTAATC	AAGAAGAAAT	TGCAACTGTA	AGCGAGGGAG	GCGGAGAGGA	CGCCATCAAA	GCAATCGCAG
	ATAATAGTTG	GGTAAATTAG	TTCTTCTTTA	ACGTTGACAT	TCGCTCCCTC	CCGCTCTCCT	GCGGTAGTTT	CGTTAGCGTC
+3	Lys Gly Glu Trp Ser Ser Leu Ser Gly Leu Glu Arg Gly Lys Ile Val Leu Lys Ile Ala Glu Leu Ile Arg Arg Asp Leu							
1401	AAAGGAGAAT	GGTCATCGCT	ATCCGGGCTT	GAACGCGGAA	AAATTGTTCT	GAAAATTGCG	GAATTAATCA	GACGCGATCT
	TTTCTCTTTA	CCAGTAGCGA	TAGGCCCGAA	CTTGGCGCTT	TTTAAACAGA	CTTTTAACGC	CTTAATTAGT	CTGCGGTAGA
+3	Glu Ser Leu Asp Thr Gly Lys Thr Leu Glu Glu Ser Lys Ala Asp Met Asp Asp Ile Ala Asn Val Phe Gln Tyr Tyr Ala							
1501	AATCTCTTGA	TACAGGAAAA	ACACTCGAAG	AAAGCAAGGC	CGATATGGAC	GATATCGCCA	ATGTTTTTCA	ATATTACGCC
	TTAGAGAACT	ATGTCCTTTT	TGTGAGCTTC	TTTCGTTCCG	GCTATACCTG	CTATAGCGGT	TACAAAAAGT	TATAATGCGG
+3	Gly Gly Glu Ile Ile Ser Ser Pro Ile Pro Asp Ser Glu Ser Lys Ile Ile Arg Glu Pro Ile Gly Val Cys Gly Gln Ile Thr							
1601	CGGAGAGATC	ATTTTCATCT	CGATTCTCTG	TTCAGAAAGC	AAAATTATTA	GGGAGCCAAT	CGGGGTTTGC	GGCCAGATCA
	GCCTCTCTAG	TAAAGTAGAG	GCTAAGGACT	AAGTCTTTTC	TTTTAATAAT	CCCTCGGTTA	GCCCCAAACG	CCGGTCTAGT

	+3	Leu Gln Ala Ser Trp Lys Ile Ala Pro Ala Leu Ala Ala Gly Asn Thr Ile Val Met Lys Pro Ser Glu Ile Thr Pro Leu	
1701	-	CTTCAAGCGA GTTGGAATAAT CGCCCCGTGCA CTGGCCGCAG GAACAACAAAT CGTCATGAAG CCGAGTGAGA TTACGCCGCT GAAGTTCCGCT CGACCTTTTTA GCGGGGACGT GACC GGCGCT CTTTGTGTA GCAGTAGCTC GGCTCACTCT AATGCGGGCA	
	+3	Lys Leu Met Glu Glu Ala Gly Val Pro Lys Gly Val Ala Asn Leu Val Leu Gly Pro Gly Ala Thr Val Gly Asp Glu Leu	
1801	-	AGCTGATGGA AGAAGCCGGT GTTCCA AAAAG GTGTCGCAA TCTTTGTCTT GGACCGGGAG CCACAGTGGG CGACGAGCTT TCGACTATAAC TATTTCGGCA CAAGGTTTTT CATCGCGTTT AGAACAAAGA CCTGGCCCCT GGTTGTCACC GCTGCTCGAA	
	+3	Asp Leu Ile Ser Phe Thr Gly Gly Ile Glu Thr Gly Lys Lys Ile Met Arg Ala Ala Ser Gly Asn Val Lys Lys Ile Ala Leu	
1901	-	TTTGATTTC TTTACGGGCG GAATTGAAAC AGGCAAAAAA ATCATGCGGG CGGCAAGCGG AACCGTCAAA AAAATCGCCC AAACTAAAGT AAATGCCCCG CTTAACTTTG TCCGTTTTT TAGTAGCGCC GCCGTTTCGC TTTGAGTTT TTTTAGCGGG	
	+3	Pro Asn Ile Val Phe Lys Asp Ala Asp Leu Glu Val Ala Val Asp Glu Ala Leu Asn Ala Val Phe Thr Phe His Ala Gly Glu	
2001	-	CCAAAATATT TTTTCAAGGA CGCGGATTTA GAAGTTGCGG TTGATCAGCG CTTAAACGCT GTATTTTTTC ACGCCGGCCA GGTTTATAAC AAAAGTTTCT CGCGCTAAAT CTTCACGCCT AACTAGTTCG AATTITGCGA CATAAAAGG TGCGGCCGGT	
	+3	Arg Leu Leu Val Glu Asp Ala Ile His Asp Gln Phe Leu Ala Glu Leu Val Lys Arg Ala Lys Arg Ile Lys Leu Gly Asn	
2101	-	GCTTGCTTGT TGAGGATGCC ATTATGATC AATTTTTGGC GGAGCTGGTC AAACGGGCAA AACGCATAAA ACTCGGAAAC CGAACGRAA ACTCCTACGG TAAGTACTAG TAAAAACCG CTCGACCAG TTTGCCCGTT TTGCGTATTT TGAGCCTTTG	
	+3	Glu Ser Gly Pro Leu Ile Ser Ala Glu His Arg Ala Lys Val Glu Lys Tyr Val Glu Ile Gly Ile Glu Lys Leu	
2201	-	AAGCGGTCG CTTATTTCGG CGAGACACAG GGCARAAGTA GAAAAATAG TAGAGATCGG AATAGAGGAA GGCGCGAAGC TTCGCCAGGC GAATAAAGCC GCCTCGTGTC CCGTTTCCAT CTTTTTATAC ATCTCTAGCC TTATCTCCTT CCGCGCTTCG	
	+3	Pro Glu Asp Pro Glu Leu Gln Asn Gly Phe Phe Tyr Glu Pro Thr Ile Phe Ser Asn Cys Asn Ser Asp Met Arg Ile Val	
2301	-	CCGGAAGATC CTGAGCTTCA AAACGGCTTT TTCTATGAAC CTACTATTTT CTCAAACTGT AATTCTGACA TGAGAACTGT GGCCTTCTAG GACTCGAAGT TTTGCCGAAA AAGATACTTG GATGATAAAA GAGTTTGCA TTAAGACTGT ACTCTTAGCA	
	+3	Pro Val Leu Thr Val Glu Thr Phe Ser Ser Glu Glu Glu Val Ile Glu Leu Ala Ala Asn Asp Thr Ile Tyr Gly Leu Ala Gly	
2401	-	CTGTATTGAC AGTCGAAGC TTCAGCTCTG AAGAAGAGGT AATCGAGCTT GCGAATGATA CCATCTATGG CTTGGCTGGA GACATAACTG TCAGCTTTGG AAGTCGAGAC TTCTTCTCCA TTAGCTCGAA CGCTTACTAT GGTAGATACC GAACCGACCT	
	+3	Ile Glu Lys Cys Glu Arg Val Ala Ala Arg Leu Arg Met Gly Thr Val Trp Ile Asn Asp Phe His Pro Tyr Phe Ala Gln Ala	
2501	-	TGAAAAGTGC GAACGGGTAG CAGCCCGCTT GAGAATGGGA ACCGTTTGGA TCAACGATTI TCATCCGTAC TTTGCACAAG ACTTTTCACG CTGCCCCATC GTCGGGCGAA CTCITTACCCT TGCCAACCT AGTTGCTAAA AGTAGGCATG AAACGTGTTT	
	+3	Gln Ser Gly Phe Gly Arg Glu Leu Gly Lys Ile Gly Leu Glu Glu Tyr Thr Glu Val Lys His Val Tyr Arg Asn Thr Lys	
2601	-	CAATCCGGGT TCGGAGCGCA CTTTGGRAAA ATAGGCCCTT AAGAATACAT AGAAGTCAAA CATGTATACC GCAATACAAA GTTAGGCCCA AGCCTGCGCT CGAACCTTTT TATCCGGAAC TTCTTATGTG TCTTCAGTTT GTACATATGG CGTTATGTTT	
	+3	Phe Asn Ser Met Met Thr Leu Asn Met Lys Val Glu Ser Met Gln Lys Phe His Thr Phe Glu Ile	
2701	-	TTAATTCATA AGAGGGGGAG ATTGATGATG ACATTAAATA TGAAGGTAGA AAGCATGCGA AATTTCCACA CATTGAAAT AATTAAGTAT TCTCCCCCTC TAACTACTAC TGTAATTTAT ACTTCCATCT TTCGTACGTC TTTAAGGTGT GTAACCTTTA	
	+1	Gly Ile Gly Ala Ile Lys His Thr Gly Glu Glu Val Ala Ala Leu Gly Val Ser Lys Ala Leu Leu Val Thr Asp Pro Gly	
2801	-	GAATCGGAGC CATCAAGCAT ACGGGTGAAG AAGTAGCTGC ACTGGGCGTT TCAAAGCGC TCCTTGTCAC AGACCGCTGG CTTAGCCTCG GTAGTTCGTA TGCCCACTCC TTCATCGACG TGACCCGCAA AGTTTTCGCG AGGAACAGTG TCTGGGACCC	
	+1	Ala Asp Pro Val Ile Glu Ser Leu Lys Glu Ala Gly Ile Glu Val Val Leu Thr Asn Lys Val Glu Pro Asn Pro Pro Val Arg	
2901	-	TGATCCCGTA ATCGAATCAC TTAAGAAGC AGGCATTGAA TGGTGACTCT TTAATLAAAG TGAGCCAAAC CCGCGTGTCC ACTAGGGCAT TAGCTTAGTG AATTCTTTCG TCCGTAACCT CACCATGAGA AATTATTICA ACTCGGTTTG GGCGGACAGG	
	+1	Glu Leu Tyr Lys Lys Glu Asn Cys Asn Gly Leu Val Ala Val Gly Gly Gly Ser Ser Met Asp Thr Ala Lys Ala Ile Gly	
3001	-	GAGCTTTTACA AAAAAGAGAA CTGTAATGGT TTGGTGGCAG TCGGAGGCGG AAGCTCCATG GATACAGCAA AAGCAATCGG CTCGAAATGT TTTTCTCTTT GACATTACCA AACCACCGTC AGCCTCCGCT TCGAGGTAC CTAATGCTGTT TCGTTTAGCC	
	+1	Gly Ser Val Thr Asp Tyr Glu Ala Ala Asp Gly Lys Lys Pro Leu Glu Asn Arg Ile Pro Pro Leu Thr Thr Ile Pro Thr	
3101	-	GAAGCGTGCT TGATTATGAA GCGGCAGATG GGAaaaaaac GCTGGAaaac CGcattccct cGctgagcac Aatccccact CTTCGCaCGa ActaatActt Cgcgcgtctac Cctttttttg cgaccttttg cGctaaggag cGgaCTGCTG tTaagggtGa	
	+1	Glt Val Thr Gln Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Glu Arg Glu Phe Lys Phe Asn Thr Gly Gly Pro Leu Ile Ala Ala His Leu	
3201	-	AGTAACCCAA TGGGCGGTTA TCACAGATGA AGAAAGAGAA TTCAAATTCA ACACGGGCGG TCCGCTGATT GCAGCGCACT TCATTGGGTT ACCCGCCAAT AGTGCTACT TCTTTCTCTT AAGTTTAAAGT TGTGCCCGCC AGCGCACTAA CGTCGCGTGA	
	+1	Leu His Val Ser Met Pro Pro His Val Thr Ala Met Thr Gly Ile Asp Ala Leu Ala His Ala Ile Glu Cys Tyr Thr Met	
3301	-	CTTCATGTTT CAATGCTCC GCATGTAACA GCTATGACGG AATTGATGCT GCTCGCCCAT GCCATTGAGT GCTATACAAT GAAGTACAAA GTTACGGAGG CGTACATTGT CGATACTGCC CTTAACTACG CGAGCGGGTA CGGTAECTCA CGATATGTTA	
	+1	Thr Asp Ala Val Ala Leu Met Ala Ile Glu Tyr Ala Ala His Tyr Ile Lys Arg Ala Phe Ala Asp Gly Glu Asp Leu Glu	
3401	-	CGGATCGCGT TGCCTTAATG GCGATTGAGT ATGCGCTCTCA TTACATCAAG AGGGCATTTG CTGATGGAGA GGATCTGGAA GCCTACGCCA ACCGAATTAC CGCAATTACA TACCGCGAGT AATGATGTTT TCCCGTAAAC GACTACCTCT CTAGACACTT	



		gbeB																											
	+1	Gln	Ala	Ala	Met	Leu	Ala	Gly	Leu	Ser	Tyr	Gly	Ser	Glu	Ser	Ala	Gly	Ala	Ala	His	Ala	Met	Ser	Gln	Thr	Leu	Gly	Gly	Ile
3501		GGCTGCGATG	CTTGCCGGTC	TTTCTTACGG	AAGTGAATCA	GCGGGCGCTG	CTCATGCGAT	GAGCCAAACG	CTTGGCGGTA	CCGACGCTAC	GAACGGCCAG	AAAGAATGCC	TTCACCTAGT	CGCCCGCGAC	GAGTACGCTA	CTCGGTTTGC	GAACCGCCAT												
		gbeB																											
	+1	Gln	Cys	Val	Ala	Ala	Met	Met	Gly	Pro	Val	Met	Glu	Tyr	Asn	Trp	Lys	Gly	Tyr	Pro	Glu	Lys	Phe	Ala	Arg	Ile	Ala	Lys	
3601		CAATGTGTAG	CGGCGATGAT	GGGCCCTGTC	ATGGAATACA	ACTGGAAGGG	CTATCCTGAG	AAGTTTGCGC	GTATTGCGAA	GTTACACATC	GCCGCTACTA	CCCGGGACAG	TACCTTATGT	TGACCTTCCC	GATAGGACTC	TTCAAACGCG	CATAACGCTT												
		gbeB																											
	+1	Ser	Lys	Met	Thr	Thr	Glu	Glu	Ala	Ala	Lys	Ala	Ser	Val	Asn	Trp	Met	Tyr	Asp	Leu	Val	Glu	Asp	Leu	Glu	Val	Pro	Thr	
3701		GCAAGATGAC	AACAGAAGAA	GCTGCGAAAG	CATCTGTCAA	TTGGATGTAT	GATCTGGTCG	AAGATTTAGA	AGTGCCGACT	CGTTCCTACTG	TTGTCTTCTT	CGACGCTTTC	GTAGACAGTT	AACCTACATA	CTAGACCAGC	TTCTAAATCT	TCACGGCTGA												
		gbeB																											
	+1	Ser	Pro	Asp	Met	Ile	Glu	Arg	Leu	Ser	Lys	Glu	Ala	Met	Lys	Asp	Pro	Gln	Thr	Phe	Gly	Asn	Pro	Arg	Asp	Leu	Asn	Glu	Lys
3801		ACCTGATATG	ATCGAACGCT	TGTCTAAAGA	AGCAATGAAA	GATCCGCAAA	CCTTCGGAAA	CCCTAGAGAT	TTAAATGAAA	TGGACTATAC	TAGCTTGCGA	ACAGATTCTT	TCGTTACTTT	CTAGGCGTTC	GGAAGCCTTT	GGGATCTCTA	AATTTACTTT												
		gbeB																											
	+1	Lys	Arg	Cys	Phe	Asn	Leu	Thr	Pro	Lys	Thr	Val																	
3901		AAACGCTGCT	TTAACCTTAC	GCCTAAAACG	GTATAATCAA	AATCCCGCTC	CITTACAGAG	CGGGATTITT	TGGGATAATG	TTTGCGACGA	AATTGGAATG	CGGATTTTGC	CATATTAGTT	TTAGGGCGAG	GAAATGTCTC	GCCCTAAAAA	ACCCTATTAC												
4001		GATAAGAAGG	AAGGTGCCAG	CTGATGTGGA	AGCGTATGAC	TGCAAAAGCG	GAAGGCTTAT	ATATCGCAGA	TACAAAAAGC	CTATTCTTCC	TTCCACGGTC	GACTACACCT	TCGCATACTG	ACGTTTTTCG	CTTCCGAATA	TATAGCGTCT	ATGTTTTTCC												
4101		CAAGCTTGAT	TTTGATTATG	GCGGCATCCC	CGG																								
		GTTCGAACATA	AACTAATAC	CGCCGTAGGG	GCC																								

**Abbildung 51: Nukleotidsequenz der *gbsAB*-Region aus *B. subtilis*.**

Dargestellt sind eine schematische Übersicht des *gbsAB*- Glycin Betain -Biosynthese-Genclusters (**A**) und die DNA Sequenz der *gbsAB*-Region (**B**) mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz der kodierten Proteine GbsR und GbsAB. Die potentielle Ribosomenbindestellen (rbs) und die jeweiligen Promotoren (-10, -35) sind gekennzeichnet. *gbsA* kodiert für die Glycin Betain Aldehyd Dehydrogenase (GbsA), *gbsB* für die Alkohol Dehydrogenase (GbsB), *gbsR* für einen möglichen transkriptionellen Regulator.

## Anhang B:

Hier sind die Sequenzen der *gbsR-A*-Abschnitte gezeigt, welche die *treA*-Fusionsstämme GNB52, GNB53, GNB54, DHB4 und DHB5 tragen. Mit Hilfe dieser Stämme konnte das minimale, für die Regulation des *gbsAB*-Operons wichtige DNA- Fragment von 100 bp ermittelt werden.

401	CAAAATATTTT GGAAGTAAAT GGGGTGTTTT TCCCGTATTT TTCAAAATTT TAGTAGTTAC ATCAAAAAA CCGCTAGITT CCGAGGCGTT TTCTGCTTTA GTTTATAAAA CTTTCATTTA CCCCACAAAA AGGGCATAAA AAGTTTAAAC ATCATCAATG TAGTTTTTTT GCGGATCAAA GGGTCCGCAA AAGACGAAAT
501	CTTTGTTTTG ACCGGTATAA ATTTAAAAAT TTCTCCGGTC TGCACCGATT CAGCAAGCCG TTTCAGCCAG TCATAGTAAG CTTTAGAGCT TTCCAGCTGA GAAACAAAGC TGGCCATATT TAAATTTTTA AAGAGGCCAG ACGTGGCTAA GTGTTTCGGC AAAGTCGGTC AGTATCATTC GAAATCTCGA AAGGTCGACT
601	TCATATAACT GCAGTGCTTC ATTTTGTATA TCTTCATCGA GATCTTCCTT GCATAAARCC TTTTGTAAAT CAGCTTGAGC TTCTCGATC GCTGTTACAT AGTATATTGA CGTCACGAAG TAARAACTAT AGGAGTAGCT CTAGAAGGAA CGTATTTTGG AAAACATTTA GTCGAACTCG AAGGAGCTAG CGACAATGTA
701	TCACCTGAAC CTCCCGCTCC CATTAGGTG GAAAGAAATT TGTGAAAAAT TTAAAGAAAT CTTTCTCAGC CACAAATGTA TGCTTCCGGA TGCCCCGGTG AGTGAACCTG GAGGCGGAGG GTAAATCCAC CTTTCTTTAA ACACITTTTA AATTCTTTTA GGAAGAGTCG GTGTTTACAT ACGAAGCGCT ACGGGGCCAC
801	AAATGTTTTT TCACTACAT TTAAGTCTTG AAGCTTTTTG ACGCCAGTGC TCATGCTTGG TTTGCTCATT TGCAACTCCT CACGCATTTC GTCAAGCGTC TTTACAAAAA AAGTGATGTA AATTCAGAAC TTGAAAAAC TCGGTTCAGC AGTACGAACC AAACGAGTAA ACGTTGAGGA GTGCGTAAAG CAGTTCCGAC
901	ATCTCATCCC TCATATACAT CGTCCCATAT AAAATCCCGA CACTGCGGGT AATTCGGTAA AGATCCATCG TTTCAGCAAT GGAGTCAATA ACAAGATCCC TAGAGTAGGG AGTATATGTA GCAGGGTATA TTTTAGGGCT GTGACGCCCA TTAAGGCATT TCTAGGTAGC AAAGTCGTTA CTTCACTTAT TGTTCATAGG
1001	GAGCCTGTTT TATAGCTGCA AATTCTGGAT TTTCATCCAT ACTGACCCCT TTTTCTTTTA GAAATTTAAA TTGTTAAGT TATTTCTTTA TGTTCTTTAT CTCGGACAAG ATATCGACGT TTAAGACCTA AAAGTAGGTA TGACTGGGAG AAAAGGAAAT CTTTAAATTT AAGCAATTCA ATAAAGAAAT ACAAGAAATA
1101	CTTAAAGAAA CATGAGGAAA AGTCAAAAAG AAAAATCAAA ATGGGACTTT GACAGTTTAA AAACCATATG TTAGATTAAAG GTTGTTAAAA ACATTAAATT GAATTGCTTT GTACTCCTTT TCAGTTTTTC TTTTATGTTT TACCTTGAAA CTGTCAAAAT TTGTTATAC AATCTAATTC CAACAATTTT TGTAATTTAA
1201	TTTTTTTAA CAACTTTTAT TACGTCAAGG AGGCTTATAT GAGTCAAAAC TTATTCATTG ACGGAGAATG GATCAGTGCC GAAAAAGAAC AGATCCGCAG AAATAAATTG TTGAAATATA ATGCAGTTCC TCCGAATATA CTCAGTTTGT AATAAGTAAC TGCTCTTTAC CTAGTCACGG CTTTTTCTTG TCTAGGCGTC

**Abbildung 52: DNA-Sequenz der *gbsA*-*treA*-Fusion des Stammes GNB52.**

Die gelb markierte Sequenz zeigt den DNA-Abschnitt, der mit Hilfe der Primer *treA2/SmaI* und *treA1a/BamHI* mittels PCR amplifiziert wurde. Dieses Fragment wurde anschließend in das Plasmid pJMB1 kloniert. Daraus resultierte das Plasmid pGNB14, welches über homologe Rekombination in das Genom von *B. subtilis* integriert wurde.

1001	GAGCCTGTTT TATAGCTGCA AATTCTGGAT TTTCATCCAT ACTGACCCCT TTTTCTTTTA GAAATTTAAA TTGTTAAGT TATTTCTTTA TGTTCTTTAT CTCGGACAAG ATATCGACGT TTAAGACCTA AAAGTAGGTA TGACTGGGAG AAAAGGAAAT CTTTAAATTT AAGCAATTCA ATAAAGAAAT ACAAGAAATA
1101	CTTAAAGAAA CATGAGGAAA AGTCAAAAAG AAAAATCAAA ATGGGACTTT GACAGTTTAA AAACCATATG TTAGATTAAAG GTTGTTAAAA ACATTAAATT GAATTGCTTT GTACTCCTTT TCAGTTTTTC TTTTATGTTT TACCTTGAAA CTGTCAAAAT TTGTTATAC AATCTAATTC CAACAATTTT TGTAATTTAA
1201	TTTTTTTAA CAACTTTTAT TACGTCAAGG AGGCTTATAT GAGTCAAAAC TTATTCATTG ACGGAGAATG GATCAGTGCC GAAAAAGAAC AGATCCGCAG AAATAAATTG TTGAAATATA ATGCAGTTCC TCCGAATATA CTCAGTTTGT AATAAGTAAC TGCTCTTTAC CTAGTCACGG CTTTTTCTTG TCTAGGCGTC

**Abbildung 53: DNA-Sequenz der *gbsA*-*treA*-Fusion des Stammes GNB53.**










Die gelb markierte Sequenz zeigt den DNA-Abschnitt, der mit Hilfe der Primer *treA3/SmaI* und *treA1a/BamHI* mittels PCR amplifiziert wurde. Dieses Fragment wurde anschließend in das Plasmid pJMB1 kloniert. Daraus resultierte das Plasmid pGNB15, welches über homologe Rekombination in das Genom von *B. subtilis* integriert wurde.



## Anhang C:

Datenbankanalyse des GbsR-Proteins (P71015) aus *Bacillus subtilis*. Die Ergebnisse der Datenbankanalyse geben den Stand vom 30.10.2008 wieder. Der hier gezeigte Blast erfolgte über den SIB Network BLAST Service, ein NCBI BLAST2 Service, des Swiss Institute of Bioinformatics (<http://www.expasy.ch/tools/blast/>). Es wurden 50 GbsR-ähnliche Proteine verglichen. In der folgenden Tabelle





















**Tabelle 19:** Aufgelistet sind die folgen 50 GbsR-ähnlichen Proteine mit ihrer Zugangsnummer, ihrer Sequenzidentität zum GbsR aus *Bacillus subtilis*, Zugehörigkeit zum Organismus und ihrer Funktion bzw. der Annotation ihrer Funktion.

Accession ↕	Entry name	Status	Local alignment	Protein names ↕	Organism ↕	Length ↕	Identity ↕	Score ↕	E-value ↕
<a href="#">P71015</a>	YUAC_BACSU	★		Uncharacterized protein yuaC (ORF2)	Bacillus subtilis	180	100	360	2 e-98
<a href="#">A7Z823</a>	A7Z823_BACA2	★		YuaC	Bacillus amyloqueliciens (strain FZB42)	184	87	318	1 e-85
<a href="#">Q65FQ7</a>	Q65FQ7_BACLD	★		YuaC (Putative uncharacterized protein yuaC)	Bacillus licheniformis (strain DSM 13 / ATCC 14580)	184	78	271	1 e-71
<a href="#">B4AH18</a>	B4AH18_BACPU	★		YuaC	Bacillus pumilus ATCC 7061	185	77	267	3 e-70
<a href="#">A8FGM5</a>	A8FGM5_BACP2	★		Possible transcriptional regulator	Bacillus pumilus (strain SAFR-032)	185	76	263	5 e-69
<a href="#">A7GNT3</a>	A7GNT3_BACCN	★		YuaC	Bacillus cereus subsp. cytotoxic (strain NVH 391-98)	180	60	224	3 e-57
<a href="#">A8VR87</a>	A8VR87_9BACI	★		Transcriptional regulator-like protein	Bacillus selenitireducens MLS10	183	59	212	1 e-53
<a href="#">Q8CR07</a>	Q8CR07_STAES	★		Putative uncharacterized protein	Staphylococcus epidermidis (strain ATCC 12228)	188	57	209	7 e-53
<a href="#">Q5HL09</a>	Q5HL09_STAEQ	★		Putative uncharacterized protein	Staphylococcus epidermidis (strain ATCC 35984 / RP62A)	187	57	209	7 e-53






Fortsetzung aus der nächsten Seite

<a href="#">Q4A0Q3</a>	Q4A0Q3_STAS1	★		<b>Putative transcriptional regulator</b>	Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus (strain ATCC 15305 / DSM 20229)	186	54	198	2 e-49
<a href="#">Q9X2M0</a>	Q9X2M0_STAXY	★		<b>Putative regulatory protein</b>	Staphylococcus xylosus	186	54	197	2 e-49
<a href="#">A7KK62</a>	A7KK62_9BACI	★		<b>Putative transcriptional regulator</b>	Halobacillus dabanensis	183	56	197	3 e-49
<a href="#">Q2FDP7</a>	Q2FDP7_STAA3	★		<b>Putative uncharacterized protein</b>	Staphylococcus aureus (strain USA300)	187	55	196	6 e-49
<a href="#">A8Z5A7</a>	A8Z5A7_STAAT	★		<b>Possible transcriptional regulator</b>	Staphylococcus aureus (strain USA300 / TCH1516)	188	55	196	6 e-49
<a href="#">Q5HCT8</a>	Q5HCT8_STAAC	★		<b>Putative uncharacterized protein</b>	Staphylococcus aureus (strain COL)	187	55	195	1 e-48
<a href="#">Q9L4P9</a>	Q9L4P9_STAAU	★		<b>Putative uncharacterized protein</b>	Staphylococcus aureus	187	55	195	1 e-48
<a href="#">A6QKA1</a>	A6QKA1_STAAE	★		<b>Putative uncharacterized protein</b>	Staphylococcus aureus (strain Newman)	187	55	195	1 e-48
<a href="#">Q99R23</a>	Q99R23_STAAM	★		<b>Putative transcriptional regulator</b>	Staphylococcus aureus (strain Mu50 / ATCC 700699)	188	55	195	1 e-48
<a href="#">Q7A398</a>	Q7A398_STAAN	★		<b>Putative uncharacterized protein SA2407</b>	Staphylococcus aureus (strain N315)	188	55	195	1 e-48
<a href="#">Q79ZX2</a>	Q79ZX2_STAAW	★		<b>Putative uncharacterized protein MW2533</b>	Staphylococcus aureus (strain MW2)	188	55	195	1 e-48
<a href="#">Q6G662</a>	Q6G662_STAAS	★		<b>Putative uncharacterized protein</b>	Staphylococcus aureus (strain MSSA476)	188	55	195	1 e-48
<a href="#">Q2YWJ3</a>	Q2YWJ3_STAAB	★		<b>Putative uncharacterized protein</b>	Staphylococcus aureus (strain bovine RF122 / ET3-1)	194	55	195	1 e-48
<a href="#">Q2FV08</a>	Q2FV08_STAA8	★		<b>Putative uncharacterized protein</b>	Staphylococcus aureus (strain NCTC 8325)	187	55	195	1 e-48
<a href="#">A7X6Z6</a>	A7X6Z6_STAA1	★		<b>Putative uncharacterized protein</b>	Staphylococcus aureus (strain Mu3 / ATCC 700698)	188	55	195	1 e-48
<a href="#">A6U4Z4</a>	A6U4Z4_STAA2	★		<b>Putative uncharacterized protein</b>	Staphylococcus aureus (strain JH1)	187	55	195	1 e-48

Fortsetzung aus der nächsten Seite

<b>A5IW39</b>	A5IW39_STAA9	★		<b>Transcriptional regulators-like protein</b>	Staphylococcus aureus (strain JH9)	187	55	195	1 e-48
<b>Q6GDI9</b>	Q6GDI9_STAAR	★		<b>Putative uncharacterized protein</b>	Staphylococcus aureus (strain MRSA252)	188	55	194	2 e-48
<b>Q4L9D9</b>	Q4L9D9_STAHJ	★		<b>Similar to unknown protein</b>	Staphylococcus haemolyticus (strain JCSC1435)	184	56	194	3 e-48
<b>Q49ZJ5</b>	Q49ZJ5_STAS1	★		<b>Putative transcriptional regulator</b>	Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus (strain ATCC 15305 / DSM 20229)	188	53	178	2 e-43
<b>B2A733</b>	B2A733_NATTJ	★		<b>YuaC</b>	Natranaerobius thermophilus (strain ATCC BAA-1301 / DSM 18059 / JW/NM-WN-LF)	183	44	159	8 e-38
<b>A4J9F9</b>	A4J9F9_DESRM	★		<b>Transcriptional regulator</b>	Desulfotomaculum reducens (strain MI-1)	189	42	147	3 e-34
<b>Q5WJD5</b>	Q5WJD5_BACSK	★		<b>Transcriptional regulator</b>	Bacillus clausii (strain KSM-K16)	188	42	144	2 e-33
<b>B3KE18</b>	B3KE18_9BACI	★		<b>Transcriptional regulator</b>	Geobacillus sp. Y412MC10	189	38	133	6 e-30
<b>B1DDZ8</b>	B1DDZ8_9BACL	★		<b>Transcriptional regulator</b>	Paenibacillus sp. JDR-2	186	40	133	6 e-30
<b>Q2BCS1</b>	Q2BCS1_9BACI	★		<b>Transcriptional regulator</b>	Bacillus sp. NRRL B-14911	181	38	125	2 e-27
<b>B2A5Y4</b>	B2A5Y4_NATTJ	★		<b>Putative transcriptional regulator</b>	Natranaerobius thermophilus (strain ATCC BAA-1301 / DSM 18059 / JW/NM-WN-LF)	178	35	124	3 e-27
<b>A8VR15</b>	A8VR15_9BACI	★		<b>Alpha/beta hydrolase fold</b>	Bacillus selenitireducens MLS10	183	36	123	6 e-27
<b>B4AGG8</b>	B4AGG8_BACPU	★		<b>Transcriptional regulator</b>	Bacillus pumilus ATCC 7061	191	36	121	2 e-26
<b>A8FHI1</b>	A8FHI1_BACP2	★		<b>Transcriptional regulator</b>	Bacillus pumilus (strain SAFR-032)	178	36	121	2 e-26
<b>A7Z8W6</b>	A7Z8W6_BACA2	★		<b>YvbF</b>	Bacillus amyloliquefaciens (strain FZB42)	185	35	118	2 e-25
<b>O34709</b>	O34709_BACSU	★		<b>ORF-1 (YvbF protein)</b>	Bacillus subtilis	185	33	114	2 e-24
<b>Q5WJ46</b>	Q5WJ46_BACSK	★		<b>Transcriptional regulator</b>	Bacillus clausii (strain KSM-K16)	180	35	113	5 e-24
<b>O30512</b>	O30512_BACSU	★		<b>Putative uncharacterized protein (YvaV protein)</b>	Bacillus subtilis	180	34	111	2 e-23
<b>Q7DL41</b>	Q7DL41_BACSU	★		<b>Portion of orf between proU operon and 181 operon (Fragment)</b>	Bacillus subtilis	174	35	110	3 e-23
<b>A7Z8W1</b>	A7Z8W1_BACA2	★		<b>YvaV</b>	Bacillus amyloliquefaciens (strain FZB42)	177	34	110	3 e-23

Fortsetzung aus der nächsten Seite

<b>Q65EP1</b>	Q65EP1_BACLD	★		<b>YvbF</b> (Conserved protein YvbF)	Bacillus licheniformis (strain DSM 13 / ATCC 14580)	179	33	108	2 e-22
<b>Q5WH48</b>	Q5WH48_BACSK	★		<b>Transcriptional regulator</b>	Bacillus clausii (strain KSM-K16)	181	31	98	2 e-19
<b>A2U8N5</b>	A2U8N5_BACCO	★		<b>Putative uncharacterized protein</b>	Bacillus coagulans 36D1	181	28	94	4 e-18
<b>A8MIC7</b>	A8MIC7_ALKOO	★		<b>Transcriptional regulator</b>	Alkaliphilus oremlandii (strain OhLAs) (Clostridium oremlandii (strain OhLAs))	177	28	89	8 e-17
<b>Q58958</b>	Y1563_METJA	★		<b>DNA-binding protein MJ1563</b>	Methanocaldococcus jannaschii (Methanococcus jannaschii)	152	34	65	2 e-9

Intensity 0% 25% 50% 75% 100% (Identity)

« Previous | Page 2 of 9 | Next »

#### Job information

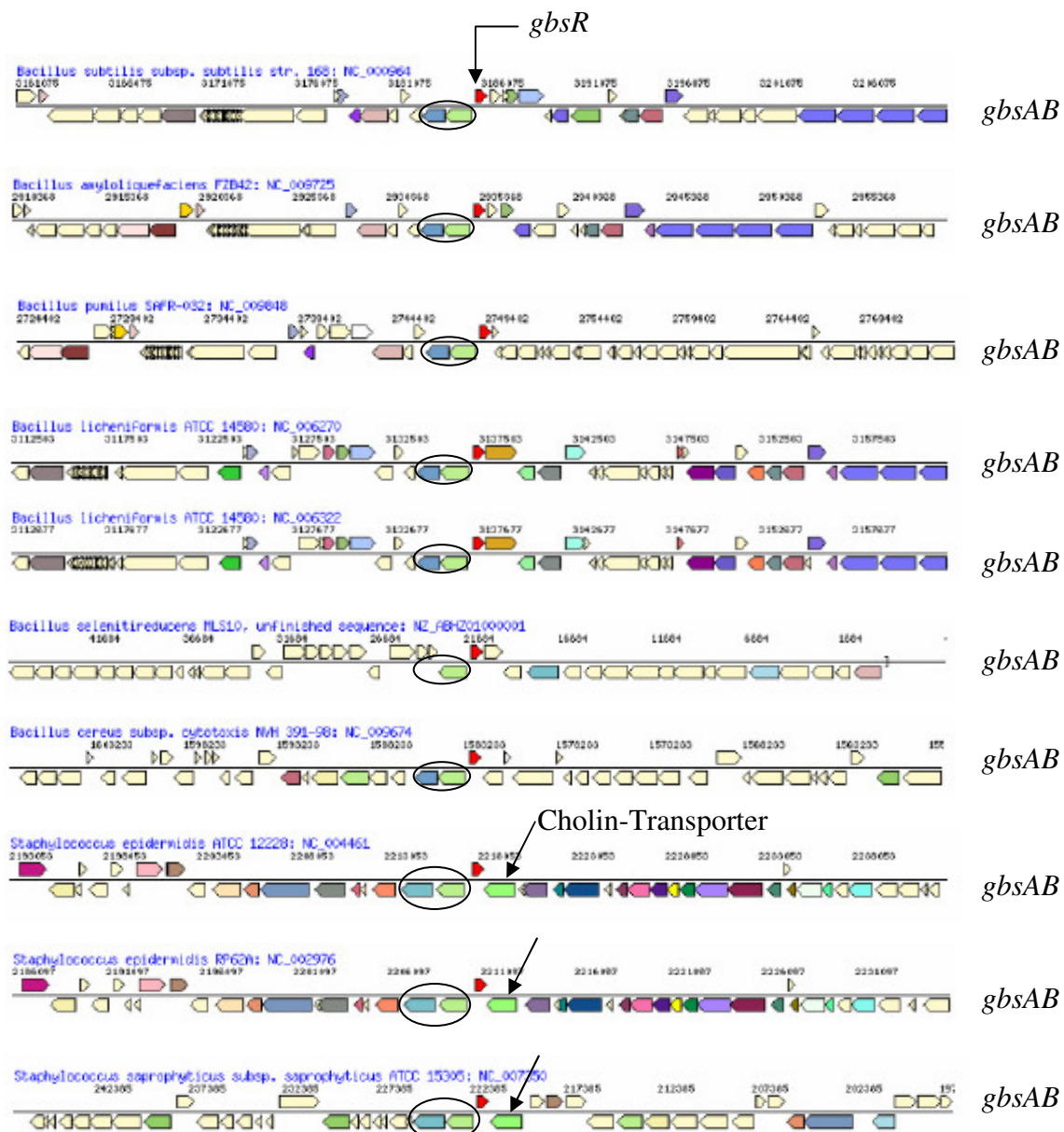
Hide | Top

Query entry Sequence ;1 AA  
 Date run: 2008-10-30 08:46:33 UTC+0100 on services.uniprot.org  
 Program NCBI BLASTP 2.2.17 [Aug-26-2007]  
 Database UniProtKB release 14.3 of 18-Oct-2008  
 7054482 sequences; 2312845965 amino acids.



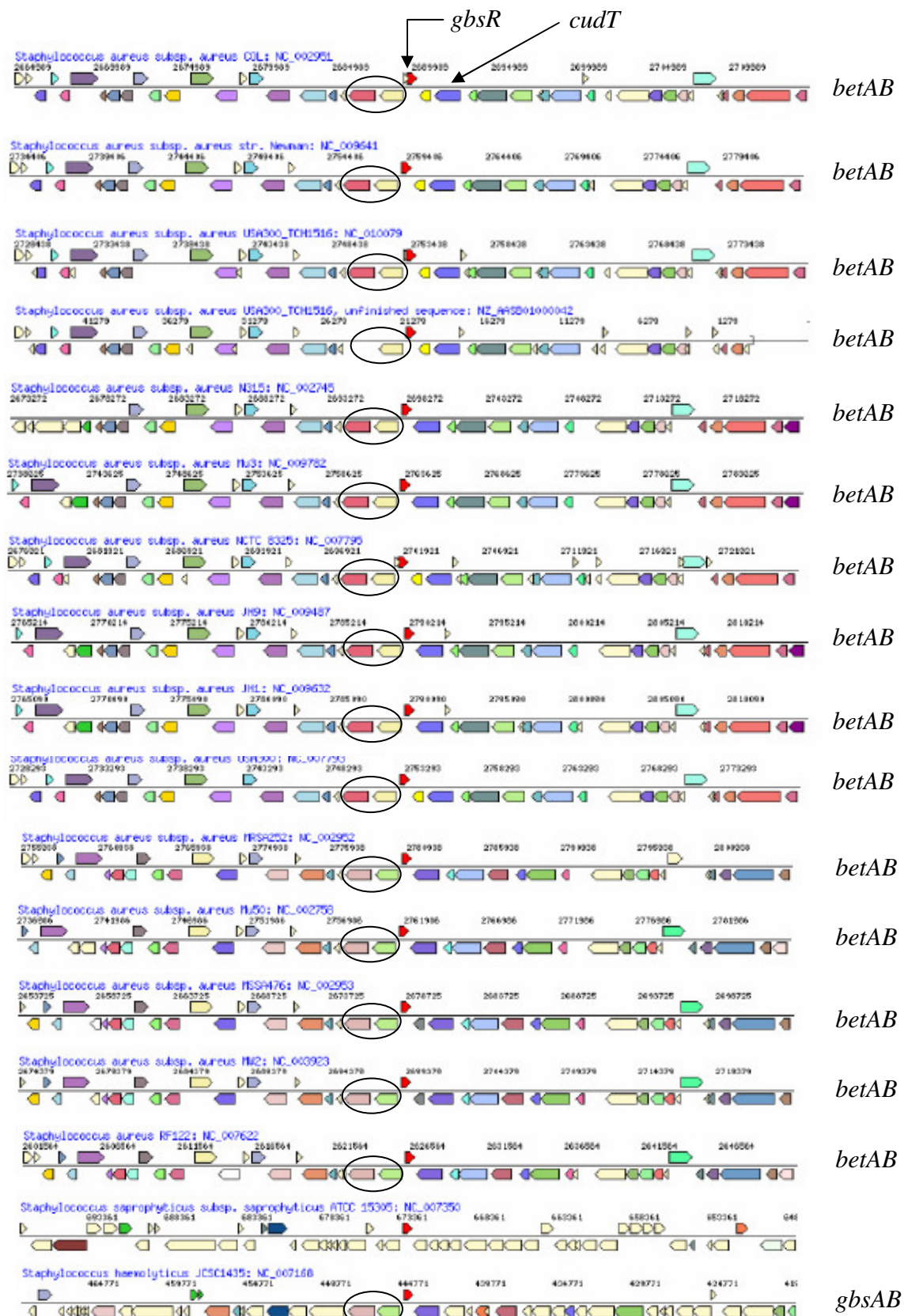
## Anhang D:

Gen-Nachbarschaftsanalyse des GbsR-Proteins (P71015) aus *Bacillus subtilis*. Die Ergebnisse der Gen-Nachbarschaftsanalyse geben den Stand vom 24.11.2008 wieder. Die hier gezeigte Analyse erfolgte über die Internetseite IMG (Integrated Microbial Genomes) des JGI (Doe Joint Genome Institute) (<http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi>). Die hier aufgeführte Reihenfolge entspricht weitestgehend dem BLAST (Es sind nicht alle Genome in der IMG Datenbank vorhanden). Es wurden 42 GbsR-ähnliche Proteine verglichen. Das GbsR-Protein bzw. die GbsR-ähnlichen Proteine sind rot dargestellt.

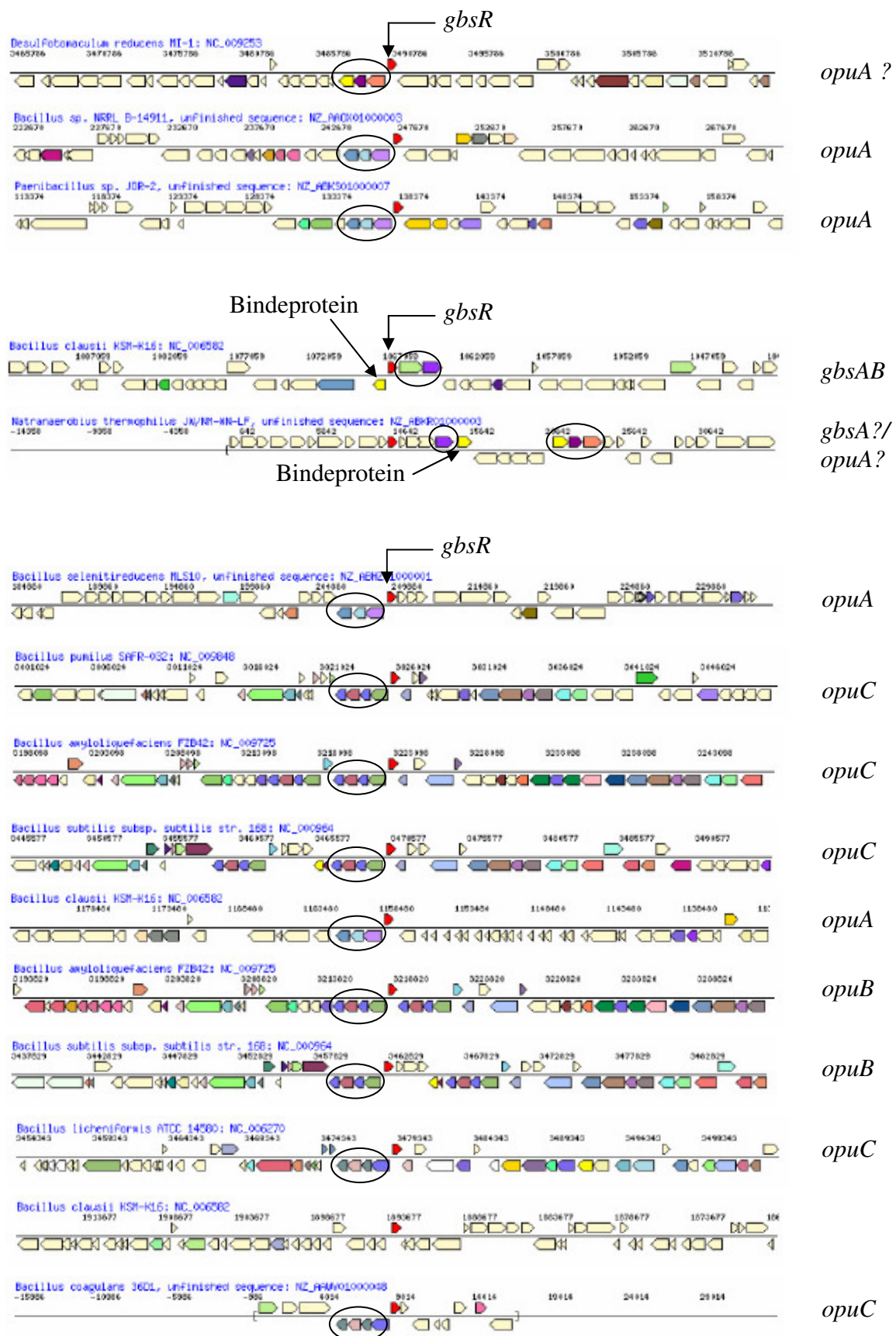




Fortsetzung auf der nächsten Seite



Fortsetzung auf der nächsten Seite



Fortsetzung auf der nächsten Seite



**Abbildung 57: Neighbourhood-Alignment von *gbsR*.**

Dargestellt ist das Strukturgen *gbsR* (rot). Außerdem ist die Organisation der direkten Gen-Nachbarschaft aufgeführt (farbig). Schwach gelb markierte Gene besitzen keine COG- (= selbe orthologe Gruppe) Zuweisung (<http://imgweb.jgi-psf.org/cgi-bin/w/main.cgi>).

## Anhang E:

Die folgenden Tabellen zeigen gefundene Cholin bzw. Glycin Betain Transportsysteme innerhalb der *Bacillus cereus*-Gruppe. Die Suche erfolgte über die Internetseite <http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi>. Die Tabellen geben die Funktion, den Namen und die Anzahl der vorkommenden Transportsysteme an.

**Tabelle 20: Transportsysteme für Cholin und Glycin Betain innerhalb der Art *B. anthracis*.**

Function ID	Name	Bac ant A04	Bac ant A03	Bac ant A09	Bac ant A02	Bac ant A05	Bac ant A08	Bac ant A22	Bac ant Ams	Bac ant Anr	Bac ant Ste	Bac ant Tsl
cog1125: abc-type proline/glycine betaine transport systems, atpase components	cog1125: abc-type proline/glycine betaine transport systems, atpase components	0	0	0	0	0	0	<u>1</u>	0	0	0	0
cog1292: choline-glycine betaine transporter	cog1292: choline-glycine betaine transporter	0	0	0	0	0	0	<u>3</u>	0	0	0	0
cog1732: periplasmic glycine betaine/choline-binding (lipo)protein of an abc-type transport system (osmoprotectant binding protein)	cog1732: periplasmic glycine betaine/choline-binding (lipo)protein of an abc-type transport system (osmoprotectant binding protein)	0	0	0	0	0	0	<u>1</u>	0	0	0	0
cog4175: abc-type proline/glycine betaine transport system, atpase component	cog4175: abc-type proline/glycine betaine transport system, atpase component	0	0	0	0	0	0	<u>1</u>	0	0	0	0
cog4176: abc-type proline/glycine betaine transport system, permease component	cog4176: abc-type proline/glycine betaine transport system, permease component	0	0	0	0	0	0	<u>1</u>	0	0	0	0
glycine betaine abc transporter, atp-binding protein	glycine betaine abc transporter, atp-binding protein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<u>1</u>
glycine betaine transporter	glycine betaine transporter	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	0	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>2</u>
glycine betaine-binding protein	glycine betaine-binding protein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<u>1</u>
glycine betaine/l-proline abc transporter, atp-binding protein	glycine betaine/l-proline abc transporter, atp-binding protein	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	0	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>1</u>
glycine betaine/l-proline abc transporter, glycine betaine/l-proline-binding protein, putative	glycine betaine/l-proline abc transporter, glycine betaine/l-proline-binding protein, putative	0	0	0	0	0	0	0	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	0
glycine betaine/l-proline abc transporter, glycine betaine/l-proline-binding protein, putative	glycine betaine/l-proline abc transporter, glycine betaine/l-proline-binding protein, putative	0	0	0	0	0	0	0	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	0
glycine betaine/l-proline abc transporter, permease	glycine betaine/l-proline abc transporter, permease	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<u>1</u>
glycine betaine/l-proline abc transporter, permease and substrate-binding protein	glycine betaine/l-proline abc transporter, permease and substrate-binding protein	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	0	0	0	0	0
glycine betaine/l-proline abc transporter, permease protein	glycine betaine/l-proline abc transporter, permease protein	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	0	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	0
glycine betaine/l-proline abc transporter, permease protein, putative	glycine betaine/l-proline abc transporter, permease protein, putative	0	0	0	0	0	0	0	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>



**Tabelle 21: Transportsysteme für Cholin und Glycin Betain innerhalb der Art *B. cereus*.**

[illegible]

**Tabelle 22: Transportsysteme für Cholin und Glycin Betain innerhalb der Art *B. thuringiensis*.**

<u>Function ID</u>	<u>Name</u>	<u>Bac thu Ham</u>	<u>Bac thu 356</u>	<u>Bac thu 977</u>
glycine betaine abc transporter, atp-binding protein	glycine betaine abc transporter, atp-binding protein	<u>1</u>	0	<u>1</u>
glycine betaine transport atp-binding protein	glycine betaine transport atp-binding protein	0	<u>2</u>	0
glycine betaine transport system permease protein	glycine betaine transport system permease protein	0	<u>2</u>	0
glycine betaine transporter	glycine betaine transporter	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>2</u>
glycine betaine-binding protein	glycine betaine-binding protein	<u>1</u>	0	<u>1</u>
glycine betaine/choline abc transporter, atp-binding protein	glycine betaine/choline abc transporter, atp-binding protein	<u>1</u>	0	<u>1</u>
glycine betaine/l-proline abc transporter, atp-binding protein	glycine betaine/l-proline abc transporter, atp-binding protein	<u>1</u>	0	<u>1</u>
glycine betaine/l-proline abc transporter, permease	glycine betaine/l-proline abc transporter, permease	<u>2</u>	0	<u>2</u>
glycine betaine/l-proline transport system permease protein prow	glycine betaine/l-proline transport system permease protein prow	0	<u>1</u>	0

## Anhang F:

Aminosäuresequenzvergleich GbsR-homologer Proteine. Die Pfeile zeigen konservierte Aromaten.

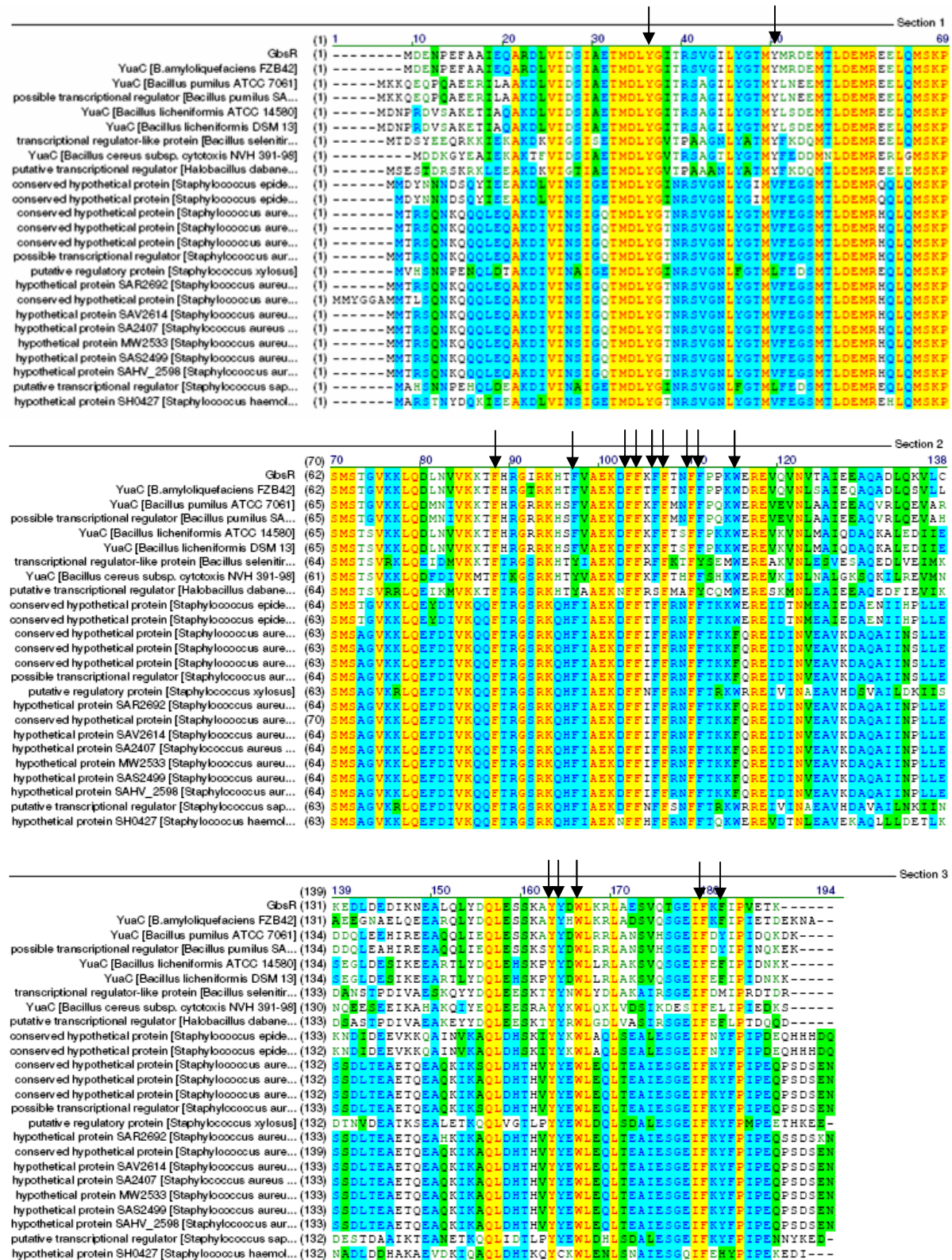


Abbildung 58: Sequenzvergleich GbsR-homologer Proteine.

Die Sequenzen stammen aus verschiedenen Bacilli und Staphylococci. Für *S. aureus* sind nur einige Vertreter dargestellt. Die Pfeile kennzeichnen die konservierten Aromaten.

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, Daniela Opper, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Dissertation wurde in der jetzigen Form oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg/Lahn, Januar 2009



## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Bremer für die Möglichkeit zur Erstellung einer Doktorarbeit in seinem Labor bedanken. Weiterhin danke ich Prof. Dr. Bremer für Überlassung des interessanten Themas, die intensive Betreuung während der Promotionszeit und die Begutachtung der Arbeit.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Mösch für die Bereitschaft zur Erstellung des zweiten Gutachtens.

Prof. Dr. Schmitt und seinem Mitarbeiter Sander Smits gilt mein Dank für die wunderbare Kooperation, vor allem für die Hilfestellung bei der Auswertung des fluoreszenzspektroskopischen Bindeassays.

Barbara Heise aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mösch danke ich für die Beantwortung aller meiner Fragen zu den EMSA-Experimenten.

Vielen Dank an alle aktuellen und ehemaligen Bremerlinge für drei schöne Jahre im Labor. Ich möchte hier keinen unerwähnt lassen. Danke an: Tamara und Jan, für die konstruktiven Diskussionen und die hilfreichen Tipps im Laboralltag, Anne R., für die Korrektur dieser Arbeit und die tolle Unterstützung in meiner experimentellen Endphase, Marco P., für die Hilfe bei verschiedenen bioinformatischen Daten, Maritha, die mir mit ihrer absolut zuverlässigen technischen Hilfe zur Seite gestanden hat; sowie Tim, Jochen, Teodora, Helena, Andre, Kathleen, Dominik, Benjamin, Anne B., Tobi, Daniela S., Alex, Vera, Till, Michael.

Ein großer Dank geht an Marina Höing, nicht nur für die Korrektur dieser Arbeit, sondern für all die Hilfe, auch über den Laboralltag hinaus.

Ein besonderer Dank geht an meinen Mann Michael und an meine alte sowie neue Familie für die Unterstützung meiner Ziele während es gesamten Studiums. Mama und Papa, Schwiegermama und Schwiegerpapa, und Michael für euer Verständnis für meine Arbeit, und für die ständige Unterstützung und Motivation.

## Lebenslauf

---

**Zur Person:** Daniela Opper, geb. Hahn  
geb. am 22. Dezember 1981 in Alzey  
verheiratet

## Schulbildung:

---

**1988 – 1992** Grund-und Hauptschule Flomborn  
**1992 – 2001** Gymnasium am Römerkastell, Alzey

## Studium und Promotion:

---

**2001 – 2005** Studium der Biotechnologie an der Fachhochschule Bingen

**Juni 2003** Vordiplom

**August 2005** Diplom

**Oktober 2004  
- August 2005** Praxissemester und Anfertigung der Diplomarbeit in der Abteilung  
Biokatalyse der BASF Aktiengesellschaft in Ludwigshafen  
Titel der Diplomarbeit: „Untersuchung der Adaptationsfähigkeit von  
*Corynebacterium glutamicum* am Beispiel von Ribose und Trehalose.“

**September 2005  
- Oktober 2005** Freie Mitarbeiterin in der Abteilung Biokatalyse der BASF AG in  
Ludwigshafen

**Seit November 2005** Promotionsstudentin an der Philipps-Universität Marburg  
Vertiefung in den Fächern Mikrobiologie, Biochemie und Genetik.

**Seit Februar 2006** Promotion an der Philipps-Universität Marburg unter Anleitung von  
Prof. Dr. Erhard Bremer  
Titel der Dissertation: „GbsR: ein neuer transkriptioneller Repressor in  
*Bacillus subtilis* zur Regulation des Cholin zu Glycin Betain  
Biosynthesewegs.“